

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**ESTUDO CINÉTICO E DE EQUILÍBRIO NA SEPARAÇÃO
CROMATOGRÁFICA DOS ENANTIÔMEROS DA CETAMINA EM
TRIACETATO DE CELULOSE MICROCRISTALINA**

Autor: Eng. Químico Ivanildo José da Silva Junior

Orientador: Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química,
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Março de 2003

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNIDADE	PC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	Si38e
V	EX
TOMBO BC	54718
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	22/10/03
Nº CPD	

BIBID, 296182

CM00186323-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

Si38e

Silva Junior, Ivanildo José da

Estudo cinético e de equilíbrio na separação cromatográfica dos enantiômeros da cetamina em triacetato de celulose microcristalina / Ivanildo José da Silva Junior.--Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Cesar Costapinto Santana.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Massa - Transferência. 3. Adsorção. I. Santana, Cesar Costapinto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

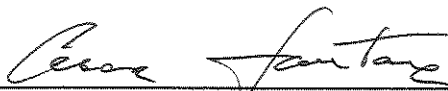
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Estudo Cinético e de Equilíbrio na Separação Cromatográfica dos
Enantiômeros da Cetamina em Triacetato de Celulose Microcristalina**

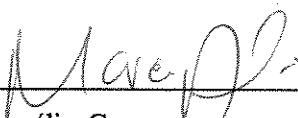
Autor: Ivanildo José da Silva Junior

Orientador: Cesar Costapinto Santana



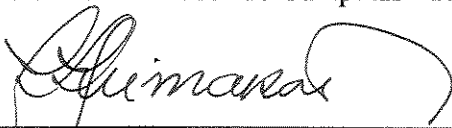
Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Universidade Estadual de Campinas - FEQ



Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco

Universidade Estadual de Campinas - FEQ



Prof. Dr. Luiz Fernando Lopes Guimarães

Universidade de São Paulo - FCFRP

Campinas, 27 de março de 2003.

591365

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Ivanildo José da Silva Junior e aprovada pela comissão julgadora em 27 de março de 2003.

A handwritten signature in black ink, reading "Cesar Costapinto Santana", written over a horizontal line.

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Aos meus pais, Ivanildo e Luzia, por serem os maiores responsáveis por tudo que sou e a quem devo todo o meu amor e respeito.

Aos meus irmãos e familiares.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, primeiramente, por sempre ter iluminado meu caminho e mesmo nos momentos mais difíceis, ter sido Ele o grande responsável pela superação e motivação a sempre continuar lutando por tudo aquilo que sempre almejei.

Ao Professor Cesar Costapinto Santana pela confiança depositada em meu trabalho, pelo interesse, preocupação e orientações seguras.

Ao Professor Everson Alves Miranda por ter cedido o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado na realização deste trabalho e também pela demonstração de interesse no andamento dos trabalhos.

A todos os professores do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

Aos amigos Vinicius de Veredas e Marco Garcia pelo apoio constante, pela paciência e preocupação demonstradas durante a realização deste trabalho.

A minha namorada Sylvia Uchôa de Albuquerque pela compreensão e apoio dedicados durante toda esta jornada e por sempre ter aceitado todas as minhas decisões visando somente o meu crescimento. A sua família pelo apoio e preocupação.

Aos amigos Amós, Ana Paula, Ânoar, Antenor, Antônio (Mossoró), Cláudia, Cristiane, Elcimar, Érika Durão, Érika, Evandro, Fabiana, Gisele, Isa, Juliana Leão, Lia, Luciana, Mariana, Marco Torres, Marcos Carpes, Marcos (Galego), Natascha, Paula, Raquel, Reinaldo, Roberta, Romi, e Rosana. A todos vocês o meu muito obrigado.

Aos amigos Adonias Neto, Aldir Fernandes, Hamilton Varela e Marcus César pela amizade ao longo destes anos.

Aos amigos da república: Alex, Antônio Sérgio e Renato.

A todos da Tchurma de Natal e de Campinas.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, mas que por algum motivo não foram mencionados o meu muito obrigado.

Resumo

Ocorre uma demanda crescente por métodos eficientes e de baixo custo para purificar estereoisômeros que formam moléculas quirais, denominados de enantiômeros, nas indústrias farmacêutica, de aromas, inseticidas e de aditivos alimentares, onde é freqüente a existência desses compostos. Métodos cromatográficos se apresentam como uma alternativa importante para a obtenção de enantiômeros com alto grau de pureza, especialmente para compostos com atividade biológica, onde grandes diferenças são observadas para a bioatividade dos dois enantiômeros. O desenvolvimento de processos preparativos, o estudo experimental e a modelagem de colunas onde ocorrem os processos de adsorção e eluição que são utilizados em cromatografia dependem em grande extensão da determinação experimental precisa de parâmetros fundamentais como a porosidade total do leito e das partículas porosas além daqueles relacionados com o equilíbrio e a transferência de massa. Colunas utilizadas na separação de misturas racêmicas de moléculas quirais utilizam fases estacionárias que são constituídas de partículas micrométricas porosas, sendo o desenvolvimento de processos de separação geralmente realizado com base em medidas efetuadas em colunas de pequeno tamanho preenchidas com a mesma fase sólida a ser utilizada em colunas maiores, devido à limitada disponibilidade de quantidades dos componentes a serem adsorvidos. Um procedimento sistemático para a determinação de parâmetros de interesse foi realizado neste trabalho utilizando-se o método dos momentos com a utilização de traçadores de diferentes massas moleculares e capacidade de adsorção, permitindo a obtenção da porosidade total do sistema e da porosidade das partículas da fase estacionária triacetato de celulose microcristalina. Os coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa em fase diluída foram determinados para cinco diferentes temperaturas na faixa de 25°C a 50°C utilizando-se injeção em coluna de misturas racêmicas do anestésico cetamina. Foi também determinada a isoterma de adsorção na temperatura de 25°C e obtidos dados do efeito da quantidade de soluto adsorvido no alargamento dos picos cromatográficos. Os resultados desse trabalho servem de embasamento para o projeto de sistemas de separação preparativos como o de leito móvel simulado.

Palavras-chave: cromatografia líquida de alta eficiência; massa - transferência; adsorção.

Abstract

There is a growing demand for efficient and low cost methods for the purification of the stereoisomers from chiral molecules, named enantiomers, in the manufacturing of drugs, flavours, pesticides and food additives, where these compounds are commonly encountered. Chromatographic method is considered nowadays an important alternative for the production of enantiomers with high purity, especially for compounds applied to biological systems, which discriminate between the two isomers. The development of preparative processes, the experimental study and the modelling of columns where the chromatographic processes of adsorption and elution take place depend strongly on the experimental determination of some fundamental parameters. These are the total and interstitial porosity of the bed of adsorbent particles, and equilibrium and mass transfer parameters. Columns employed in the separation of racemic mixtures are packed with stationary phases constituted of micrometric porous particles. The development of separation processes at preparative scale are accomplished based on measurements made with small size columns packed with the same stationary phase. A systematic procedure for the determination of parameters was developed in the present work through the method of moments with the utilization of tracers with different molecular weight and adsorption capacities, allowing the measurement of the total porosity of the bed and the porosity of the particles of the stationary phase microcrystalline cellulose triacetate. The coefficients of axial dispersion and mass transfer were determined through injections of racemic ketamine, for five different temperatures ranging from 25 to 50°C. The adsorption isotherm was determined in the temperature of 25 °C, and the effect of the amount of injected solute on the peak shape was studied. The results of this work will represent a base for the project of the experimental conditions of a preparative simulated moving bed plant.

Keywords: High performance liquid chromatography; mass transfer; adsorption

Lista de Símbolos

A	Coeficiente da equação de Van Deemter (cm)
B	Coeficiente da equação de Van Deemter ($\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$)
C	Coeficiente da equação de Van Deemter (min)
a	Parâmetro das isothermas de adsorção nas Equações 2.28, 2.30 e 2.31
b	Parâmetro das isothermas de adsorção nas Equações 2.28, 2.30 e 2.31 (L g^{-1})
c	Concentração do soluto na fase móvel (g L^{-1})
d_p	Diâmetro das partículas (cm)
D_L	Coeficiente de dispersão axial ($\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$)
D_m	Difusividade molecular ($\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$)
D_p	Difusividade no poro ($\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$)
$HETP$	Altura equivalente a um prato teórico (cm)
ΔH_{ads}	Entalpia molar de adsorção (kJ mol^{-1})
k_m	Coeficiente de transferência de massa global (min^{-1})
k_f	Coeficiente de transferência de massa externo (cm min^{-1})
k	Fator de retenção
K	Coeficiente de distribuição apresentado na Figura 2.11
K_p	Constante de equilíbrio
K_F	Constante na Eq. 2.29
L	Comprimento da coluna (cm)
M	Massa molecular (g/gmol)
n	Constante na Eq. 2.29
N_p	Número de pratos teóricos
Pe_{Mp}	Peclet mássico da partícula
q	Concentração do soluto na fase estacionária (g L^{-1})
q^*	q em equilíbrio com c (g L^{-1})
R	Constante universal dos gases ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)
Re_p	Número de Reynolds mássico da partícula
Sh_p	Número de Sherwood mássico da partícula
T	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$, K)

t	Tempo (min)
t_M	Tempo de retenção do soluto na ausência da coluna (min)
t_R	Tempo de retenção do componente retido (min)
t_0	Tempo de retenção do componente não retido (min)
u	Velocidade superficial da fase móvel (cm min^{-1})
V_F	Volume de retenção do ponto de inflexão na curva de ruptura (mL)
V_a	Volume do adsorvente (mL)
V_b	Volume molar à temperatura de ebulição (cm^3)
V_{vc}	Volume de vazios da coluna (mL)
V_M	Volume morto externo a coluna (mL)
V_0	Volume morto do sistema (soma entre V_M e V_{vc}) (mL)
z	Distancia longitudinal da coluna (cm)

Símbolos gregos

α	Seletividade
ε	Porosidade do leito
ε_T	Porosidade total do leito
ε_p	Porosidade da partícula
γ_1	Parâmetro na Eq. 2.24
γ_2	Parâmetro na Eq. 2.24
γ	Fator de tortuosidade
μ	Primeiro momento (min)
σ^2	Segundo momento (min^2)
ν	Viscosidade cinemática ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
ϕ	Coefficiente de associação do solvente na Eq. 4.2
η	Viscosidade ($\text{g cm}^{-1} \text{s}^{-1}$)
u	Parâmetro de heterogeneidade dos modelos de isoterma de adsorção Langmuir-Freundlich e Tóth

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Fases estacionárias mais usadas atualmente para separações preparativas.

Tabela 3.1 – Proporção das vazões entre a fase móvel e as soluções dos enantiômeros.

Tabela 4.1 – Volume morto determinado com injeção do TTBB nas conexões do sistema de CLAE sem a presença da coluna para cada vazão estudada.

Tabela 4.2 – Resultado do primeiro momento para o TTBB e dextrana azul.

Tabela 4.3 – Fatores de capacidade (k) e seletividades (α) para cada temperatura estudada a vazão de 1,0 mL/min na separação da mistura racêmica.

Tabela 4.4 – Fatores de capacidade e seletividade a vazão de 1,0 mL/min dentro da faixa de temperatura estudada para os enantiômeros da cetamina.

Tabela 4.5 – Valores de K_p para os enantiômeros da cetamina.

Tabela 4.6 – Parâmetros A e C da equação de Van Deemter para a *S*-cetamina.

Tabela 4.7 – Parâmetros A e C da equação de Van Deemter para a *R*-cetamina.

Tabela 4.8 – Parâmetros A e C da equação de Van Deemter para o TTBB.

Tabela 4.9 – Valores de D_L/u e k_m obtidos a partir da análise dos momentos para os enantiômeros da cetamina.

Tabela 4.10 – Valores de D_L/u obtidos a partir da análise dos momentos para o TTBB.

Tabela 4.11 – Coeficientes de difusão molecular.

Tabela 4.12 – Variação dos valores de k_f com a velocidade superficial da fase móvel a temperatura de 25°C.

Tabela 4.13 – Variação dos valores de k_f com a velocidade superficial da fase móvel a temperatura de 30°C.

Tabela 4.14 – Variação dos valores de k_f com a velocidade superficial da fase móvel a temperatura de 40°C.

Tabela 4.15 – Variação dos valores de k_f com a velocidade superficial da fase móvel a temperatura de 50°C.

Tabela 4.16 – Resistência à transferência de massa devido ao transporte externo.

Tabela 4.17 – Resistência à transferência de massa devido à difusão no poro.

Tabela 4.18 – Valores de difusividade no poro.

Tabela 4.19 – Variação na taxa D_p/D_m com a temperatura para os enantiômeros da cetamina.

Tabela 4.20 – Parâmetros das isotermas de adsorção obtidos pela análise frontal.

Lista de Figuras

Figura 2.1 – Esquema básico de um equipamento de CLAE.

Figura 2.2 – Preparação de enantiômeros.

Figura 2.3 – Representação de fase estacionária do tipo Pirkle e as suas interações com o soluto.

Figura 2.4 – Estrutura química da celulose e amilose.

Figura 2.5 – Estrutura do MCTA.

Figura 2.6 – Mecanismo de reconhecimento quiral proposto por Hesse e Hagel.

Figura 2.7 – Estrutura das ciclodextrinas α , β e γ (n igual a 1, 2 e 3, respectivamente).

Figura 2.8 – Complexação ternária estereoseletiva.

Figura 2.9 – Processo de imobilização de FEQs baseado em polissacarídeos.

Figura 2.10 – Variação de número de pratos teóricos com a velocidade superficial da fase móvel de acordo com a equação de Van Deemter.

Figura 2.11 – Tipos de isotermas de adsorção: (a) isoterma de adsorção linear; (b) isoterma do tipo Langmuir; (c) isoterma do tipo anti-Langmuir. K representa o coeficiente de distribuição do soluto.

Figura 2.12 – Método da análise frontal para determinação da concentração de equilíbrio na fase estacionária. A curva de ruptura é representada pela linha sólida.

Figura 2.13 – Cromatograma típico obtido na determinação de isotermas de equilíbrio pelos métodos da análise frontal através de pontos característicos (AFPC).

Figura 2.14 – Cromatograma típico obtido na determinação de isotermas de equilíbrio pelo método da eluição através de pontos característicos (EPC).

Figura 3.1. – Estrutura química da cetamina. O símbolo (\star) representa o centro de quiralidade da molécula da cetamina.

Figura 3.2 – Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado na realização dos experimentos.

Figura 4.1 – Primeiro momento vs inverso da velocidade superficial para o TTBB (■) e para a dextrana azul (●) a 30°C.

Figura 4.2 – Perfis de eluição da cetamina racêmica (1,5 g/L) a vazão de 1,0 mL/min da fase móvel e volume de injeção igual a 20 µL: (a) 10 °C, (b) 20 °C, (c) 25 °C, (d) 30 °C, (e) 40 e (f) 50 °C.

Figura 4.3 – Tempo de retenção da cetamina racêmica como função da temperatura a uma vazão de 1,0 mL/min da fase móvel. *S*-cetamina é representada pelo símbolo (●) e a *R*-cetamina pelo símbolo (■).

Figura 4.4 – Perfis de eluição da *S*-cetamina (2,0 g/L) a vazão de 1,0 mL/min da fase móvel e volume de injeção igual a 20 µL: (a) 25 °C, (b) 30 °C, (c) 40 °C e (d) 50 °C.

Figura 4.5 – Perfis de eluição da *R*-cetamina (2,0 g/L) a vazão de 1,0 mL/min da fase móvel e volume de injeção igual a 20 µL: (a) 25 °C, (b) 30 °C, (c) 40 °C e (d) 50 °C.

Figura 4.6 – Determinação das constantes de equilíbrio de adsorção para *S*-cetamina (●) e *R*-cetamina (■) pela análise do primeiro momento: (a) 25 °C, (b) 30 °C, (c) 40 °C, e (d) 50 °C.

Figura 4.7 – Gráfico de Van Deemter para a *S*-cetamina a: (■) 25 °C, (●) 30 °C, (▲) 40 °C e (▼) 50 °C.

Figura 4.8 – Gráfico de Van Deemter para a *R*-cetamina a: (■) 25 °C, (●) 30 °C, (▲) 40 °C e (▼) 50 °C.

Figura 4.9 – Gráfico de Van Deemter para o TTBB a: (■) 25 °C, (●) 30 °C, (▲) 40 °C e (▼) 50 °C.

Figura 4.10 – Dependência da constante de equilíbrio de adsorção linear (K_p) com a temperatura para os enantiômeros da cetamina *S*-cetamina é representada pelo símbolo (●) e a *R*-cetamina pelo símbolo (■).

Figura 4.11 – Curva de calibração absorbância vs concentração para os enantiômeros da cetamina: (a) *S*-cetamina; (b) *R*-cetamina.

Figura 4.12 – Análise frontal para determinação das isotermas de adsorção dos enantiômeros da cetamina a 25°C. As leituras no espectrofotômetro foram realizadas com comprimento de onda igual a 254 nm.

Figura 4.13 – Isotermas de adsorção dos enantiômeros da cetamina em MCTA a 25 °C obtidos pelo método da análise frontal. *S*-cetamina é representada pelo símbolo (●) e a *R*-cetamina pelo símbolo (■).

Figura 4.14 – Perfis de eluição para injeções de soluções concentradas (20 g/L) dos enantiômeros da cetamina a 25 °C e 1,0 mL/min: (a) *S*-cetamina; (b) *R*-cetamina. Volumes de injeção: 20, 50 e 200 µL.

Índice

Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Símbolos	vi
Lista de Tabelas	viii
Lista de Figuras	ix
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. <i>Os Enantiômeros</i>	1
1.2. <i>Colocação do Problema</i>	2
1.3. <i>Relevância do Trabalho</i>	4
1.4. <i>Objetivos</i>	5
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica	6
2.1. <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	6
2.2. <i>Resolução de Moléculas Racêmicas por Cromatografia Líquida</i>	9
2.3. <i>Cromatografia líquida quiral</i>	10
2.3.1. <i>Fase estacionária quiral</i>	11
2.3.1.1. <i>Histórico</i>	11
2.3.1.2. <i>Tipos de fases estacionárias quirais</i>	12
<i>Fase estacionária do tipo Pirkle</i>	13
<i>Fase estacionária com polissacarídeos helicoidais</i>	14
<i>Fase estacionária com cavidades quirais</i>	16
<i>Complexação de ligantes ternários</i>	17
<i>Proteínas como fases estacionárias</i>	18
2.3.1.3. <i>Fases estacionárias baseadas em polissacarídeos</i>	19
2.3.2. <i>Fase móvel</i>	21
2.4. <i>Transferência de massa em colunas cromatográficas</i>	23
2.4.1. <i>Cinética de transferência de massa em colunas cromatográficas</i>	23
2.4.2. <i>Método dos momentos para isothermas lineares</i>	26
2.4.3. <i>Altura equivalente a um prato teórico</i>	28
2.5. <i>Isotermas de adsorção</i>	31
2.5.1. <i>Modelos de isotermas de adsorção</i>	33

<i>Modelo de isoterma de Langmuir</i>	33
<i>Modelo de isoterma de Freundlich</i>	34
<i>Modelo de Tóth</i>	34
<i>Modelo de isoterma Langmuir – Freundlich</i>	35
2.5.2. <i>Métodos de determinação de isotermas de adsorção em colunas</i>	35
<i>Análise frontal</i>	36
<i>Análise frontal através de pontos característicos</i>	38
<i>Eluição através de pontos característicos</i>	40
2.5.3. <i>Sobrecarga da coluna</i>	41
Capítulo 3 – Materiais e Métodos	42
3.1. <i>Materiais</i>	42
3.1.1. <i>A cetamina</i>	42
3.1.2. <i>O adsorvente</i>	43
3.1.3. <i>Aparelhagem experimental</i>	44
3.2. <i>Métodos</i>	45
3.2.1. <i>Experimentos com soluções diluídas – análise dos momentos</i>	45
<i>Caracterização da coluna - determinação das porosidades</i>	45
<i>Separação cromatográfica com elevação da temperatura</i>	46
<i>Parâmetros cromatográficos de separação</i>	46
<i>Constantes de equilíbrio de adsorção linear, coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa global</i>	47
3.2.2. <i>Experimentos com soluções concentradas</i>	48
<i>Determinação das isotermas de adsorção pelo método da análise frontal</i>	48
<i>Estudo de sobrecarga da coluna</i>	49
Capítulo 4 – Resultados e Discussões	50
<i>Experimentos com soluções diluídas</i>	50
4.1. <i>Determinação das porosidades total, do leito e das partículas</i>	50
4.2. <i>Variação dos tempos de retenção com elevação da temperatura</i>	53
4.3. <i>Determinação dos perfis de eluição para os enantiômeros da cetamina</i>	55
4.4. <i>Determinação dos parâmetros cromatográficos de separação</i>	58
4.5. <i>Determinação das constantes de equilíbrio de adsorção linear</i>	58

4.6. <i>Determinação dos coeficientes de dispersão axial e dos parâmetros de transferência de massa</i>	60
4.7. <i>Análise termodinâmica de adsorção</i>	70
<i>Experimentos com soluções concentradas</i>	71
4.8. <i>Determinação das isotermas de adsorção</i>	71
4.9. <i>Estudo de sobrecarga da coluna</i>	75
Capítulo 5 – Conclusões	77
Sugestões para futuros trabalhos	79
Bibliografia	80

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. Os Enantiômeros

Enantiômeros são isômeros os quais diferem uns dos outros apenas pela maneira como os átomos estão dispostos no espaço, mas que são idênticos no que diz respeito às ligações atômicas e a sua ordenação nas respectivas moléculas. Os enantiômeros pertencem à classe de isômeros também conhecidos como *estereoisômeros*, cujas moléculas são imagens especulares uma da outra, que não se superpõem. Isômeros, cujas moléculas não são imagens especulares uma da outra são chamados de *diastereoisômeros*. A não sobreponibilidade de um objeto e a sua imagem num espelho plano determina a existência de enantiômeros é também a causa deles possuírem atividade óptica; os enantiômeros designam-se, por isso, freqüentemente, *isômeros ópticos*.

A propriedade da *quiralidade* ou *assimetria* é compartilhada por objetos que não são superponíveis a sua imagem especular [Pirkle e Pochapsky, 1990]. As moléculas que não são sobreponíveis às respectivas imagens num espelho plano dizem-se *quirais* [Morrison e Boyd, 1983], conforme a representação gráfica mostrada pela Figura 1.1. Quiralidade é a condição necessária e suficiente para a existência de enantiômeros. Todas as moléculas quirais têm enantiômeros e todas as moléculas ou objetos opticamente ativos são quirais. Por outro lado, uma molécula que se superpõe à sua imagem especular é dita *aquiral*, é opticamente inativa e não tem enantiômero [Allinger et al., 1978].

A mistura equimolecular de dois enantiômeros é denominada forma racêmica (ou também *racemato* ou *mistura racêmica*) [Sollomons, 1996], ou ainda *par dl* [Allinger et

al., 1978]. Uma mistura racêmica é opticamente inativa; misturados os dois enantiômeros, a rotação causada pelas moléculas de um dos isômeros, é exatamente anulada por uma rotação igual e de sinal contrário, causado por um número igual de moléculas do outro [Morrison e Boyd, 1983].

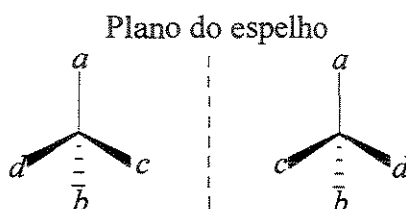


Figura 1.1 – Representação esquemática de moléculas quirais.

Uma substância opticamente ativa é aquela que produz rotação do plano da luz polarizada. Ao emergir da substância opticamente ativa a luz polarizada apresenta plano de vibração diferente do que tinha ao incidir nela. Se a rotação do plano de polarização for para a direita, ou seja, no sentido do movimento dos ponteiros do relógio, a substância diz-se *dextrógira* (*d*), (+) ou (*R*); se a rotação for para a esquerda, ou seja, no sentido contrário dos ponteiros do relógio, a substância designa-se *levógira* (*l*), (-) ou (*S*) [Morrison e Boyd, 1983].

1.2. Colocação do Problema

Em um nível molecular, quiralidade representa uma propriedade intrínseca dos “blocos estruturais da vida”, tais como aminoácidos e açúcares e, conseqüentemente, os peptídeos, proteínas e polissacarídeos. Como um resultado, processos metabólicos e reguladores intermediários em sistemas biológicos são sensíveis à estereoquímica e freqüentemente podem ser observadas respostas diferentes quando comparados às atividades dos pares dos enantiômeros [Maier *et al.*, 2001].

O conhecimento de que grande parte das drogas naturais existe na forma opticamente ativa, além de estudos feitos nas últimas décadas que demonstram diferenças nas atividades biológicas entre pares de enantiômeros levaram à conscientização da necessidade de que as drogas sintéticas sejam produzidas em sua forma enantiomericamente pura. É comum a existência de drogas que apresentam a mesma atividade biológica, mas com potências diferentes para cada enantiômero. O uso de tais drogas na forma racêmica é preocupante, uma vez que estas normalmente possuem mais de uma atividade biológica e a presença de efeitos colaterais não é desejada [Cass *et al.*, 1997].

Implicações farmacológicas e farmacocinéticas estão relacionadas à forma como a droga age no organismo, ou seja, como entra, interage e deixa o corpo. O elevado grau de estereoseletividade de muitos processos biológicos implica que, quando uma mistura racêmica é administrada como uma droga, ambos enantiômeros não deveriam ter de ser igualmente potentes. De fato, muito freqüentemente um deles representa o isômero mais ativo para uma determinada ação, enquanto o outro poderia ser até mesmo ativo, mas de um modo diferente contribuindo a efeitos colaterais, exibindo toxicidade, ou agindo como antagonico [Maier *et al.*, 2001]. Pode-se citar, como exemplo, o caso da talidomida. Em 1963 descobriu-se que a droga causava terríveis defeitos congênitos em muitas crianças recém-nascidas após a utilização desta droga pelas mães para aliviar as náuseas matinais. Mais tarde começaram a aparecer evidências indicando que um dos enantiômeros (*R*-enantiômero) tinha o efeito de curar a náusea matinal, enquanto o outro, que também estava presente na droga comercial (e em quantidades iguais a da primeira) podia ser a causa dos defeitos congênitos [Sollomons, 1996]. A *prometazina* é um exemplo raro de uma droga que apresenta a mesma atividade biológica e potência para ambos os enantiômeros, no que concerne a sua atividade anti-histamínica [Cass *et al.*, 1997].

Há pares de estereoisômeros em que as diferenças de estrutura e, portanto de propriedades entre ambos são tão pequenas que todas as medidas físicas que se podem realizar, apenas a atividade óptica é capaz de distingui-los. A separação de uma mistura racêmica para a obtenção de seus enantiômeros apresenta um grande desafio devido às propriedades físicas semelhantes e, por conseqüência, não é possível separá-los por métodos tradicionais, tais como: destilação fracionada, cristalização fracionada ou cromatografia. Dentro deste contexto, duas rotas são freqüentemente utilizadas para a obtenção de enantiômeros opticamente puros: a síntese estereoseletiva e a resolução de uma

mistura racêmica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase estacionária quiral.

Embora a síntese assimétrica seja útil para a preparação de grandes quantidades de material, o tempo requerido no seu desenvolvimento pode torná-la impraticável e não atrativa, especialmente quando se necessita de apenas pequenas quantidades do enantiômero. Neste caso, a resolução de uma mistura enantiomérica é preferível e tem-se ainda como vantagem a produção dos dois enantiômeros, enquanto a síntese assimétrica produz apenas um. Mesmo quando a síntese assimétrica é a opção, faz-se necessário um método analítico preciso para a determinação do excesso enantiomérico obtido [Cass *et al.*, 1997].

Assim, na preparação e análise de drogas quirais, é de vital importância separar suas formas enantioméricas [Haginaka, 2002], para obter uma droga com potência adequada e reduzir seus efeitos colaterais [Cass *et al.*, 1997]. A indústria se vale de métodos descobertos na pesquisa acadêmica que, além de aprimorar os métodos de síntese, tem utilizado as técnicas para separação de estereoisômeros, as quais têm se mostrado competitivo com os métodos sintéticos. Neste contexto, a cromatografia enantioseletiva em fases estacionárias quirais (FEQs) como ferramenta analítica para determinação de composições de misturas enantioméricas em estudos biológicos e farmacocinéticos é agora uma técnica bem estabelecida. A aplicação do método em uma escala preparativa para produção de materiais opticamente ativos em quantidades favoráveis para testes biológicos, estudos toxicológicos e até mesmo testes clínicos está ganhando larga aceitação [Francotte, 1994].

1.3. Relevância do Trabalho

Drogas quirais, agroquímicos, aditivos em alimentos e fragrâncias representam classes de compostos com elevado potencial econômico e científico [Maier *et al.*, 2001] e o interesse no estudo destas classes de compostos tem crescido bastante nas duas últimas décadas, sendo a indústria farmacêutica a principal responsável pelo grande número de pesquisas envolvendo estas classes de compostos.

O interesse econômico é a força motriz no desenvolvimento de novas substâncias quirais e melhorias tecnológicas relacionados com o assunto [Maier *et al.*, 2001]. O mercado das drogas quirais em 2000 ultrapassou a barreira dos 100 bilhões de dólares [Rekoske, 2001]. Algumas dessas drogas são completamente novas, mas muitas são apenas enantiômeros puros obtidos de racematos que, hoje, são vendidos como genéricos.

Agências, tais como a *US Food and Drug Administration* (FDA), geralmente têm como objetivo fundamental regular a eficácia clínica e a segurança do consumidor na determinação do que deve ser permitido para comercialização de uma droga [De Camp, 1989]. Em 1992, um documento de quatro páginas foi publicado pelo FDA's *Center for Drug Evaluation and Research* (CDER) enumerando, pela primeira vez, as diretrizes formais de desenvolvimento para drogas estereoisoméricas. O CDER concluiu que, embora os princípios ativos tivessem sido previamente e prosperamente desenvolvidos as drogas foram implementadas como misturas racêmicas e houve vários casos nos quais os enantiômeros apresentaram diferentes impactos farmacológicos e toxicológicos, produzindo problemas terapêuticos [Resko, 2001].

1.4. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo o estudo cinético e de equilíbrio na separação cromatográfica do anestésico *cetamina* em seus enantiômeros puros utilizando o *triacetato de celulose microcristalina* (MCTA) como fase estacionária quiral. Como objetivos específicos a realização de experimentos com soluções diluídas para a caracterização da coluna quiral quanto à determinação das porosidades total e do leito, obtenção de dados de equilíbrio de adsorção linear, de coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa; e experimentos com soluções concentradas tiveram como proposta a obtenção das isotermas de adsorção não-lineares, capazes de descrever de forma satisfatória sistemas em que as espécies de soluto presentes competem umas com as outras pelos sítios de adsorção da fase estacionária. O método empregado para a determinação das isotermas foi análise frontal. Também foi realizado o estudo dos efeitos de alargamento das bandas cromatográficas com o aumento do volume de injeção do soluto na coluna.

Capítulo 2

2. Revisão Bibliográfica

O presente capítulo tem como objetivo apresentar uma revisão da literatura sobre o tema *separação cromatográfica de moléculas quirais* tendo como um enfoque principal a cromatografia quiral e a determinação de parâmetros importantes para um projeto de ampliação de escala.

2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A *cromatografia* é a técnica de separação pela qual os componentes de uma mistura podem ser separados permitindo a amostra (*analito*) ser transportada através de um material em leito empacotado (*fase estacionária*) por uma *fase móvel* fluida [Sewell e Clarke, 1987]. A separação cromatográfica baseia-se na *migração diferencial* dos componentes de uma mistura, que ocorre devido às diferentes interações entre as duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária, e no *alargamento de bandas*, que é dependente de processos físicos e não da diferença de equilíbrio [Cass e Dagani, 2001].

Em cromatografia líquida, a única exigência é que a amostra seja solúvel na fase móvel. Caso contrário, o soluto não pode ser transportado através da coluna pela fase móvel. Muitas moléculas bioquímicas ou são compostos não-voláteis ou são decompostos pelo aquecimento, por exemplo, as proteínas, e não podem ser separadas através da cromatografia a gás, mas elas podem ser separadas por cromatografia líquida com uma fase móvel adequada [Sewell e Clarke, 1987].

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade [Guimarães e Collins, 1997].

Os aparelhos empregados em CLAE, mostrados esquematicamente na Figura 2.1, são chamados de *cromatógrafos a líquido*. Eles se caracterizam por terem os seguintes componentes [Ciola, 2000]:

- Reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel;
- Sistema de introdução da amostra (injetor);
- Coluna cromatográfica;
- Sistema de detecção (um ou mais detectores);
- Sistema de registro e tratamento de dados.

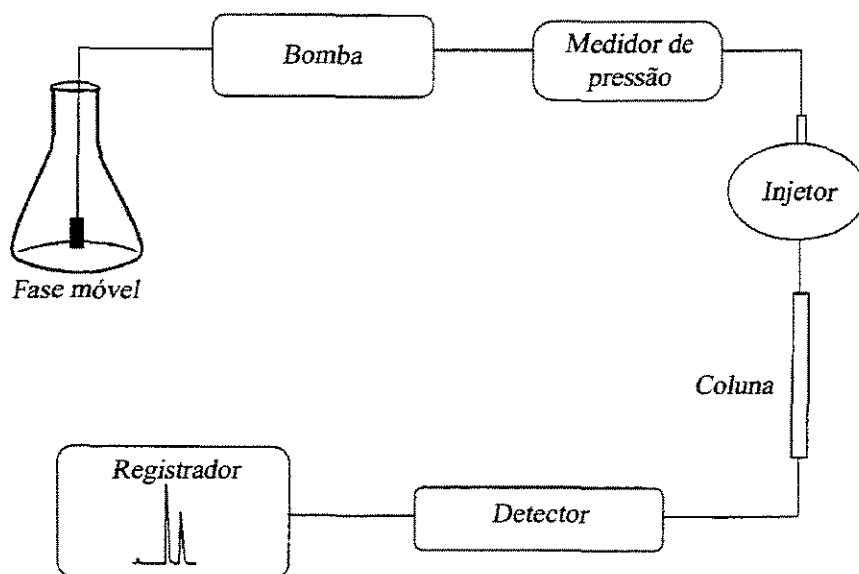


Figura 2.1 – Esquema básico de um equipamento de CLAE (Adaptado de Cass e Degani, 2001).

Em cromatografia líquida, a força da gravidade ou bombas peristálticas são usadas para forçar a fase móvel atravessar a coluna. Na CLAE, uma bomba capaz de fornecer fase móvel a uma pressão de até 6000 psi é usada. Na *eluição isocrática*, um único eluente é empregado e fornecido por uma única bomba. Na *eluição gradiente* é aumentado a força da eluição da fase móvel durante a corrida cromatográfica para encurtar o tempo de eluição do componente da amostra mais fortemente retida. Isto pode ser feito por meio de um passo gradiente ou gradiente contínuo. Em um passo gradiente, a fase móvel é abruptamente trocada de um solvente por outro, enquanto que em um gradiente contínuo, a força de eluição da fase móvel é gradativamente modificada pela mistura com o segundo solvente com o primeiro em várias proporções durante o curso da corrida cromatográfica. Cada eluente deve ter uma bomba independente ou, alternativamente, válvulas proporcionais devem ser utilizadas com uma única bomba [Fausnaugh, 1990].

A migração diferencial ou movimento de um componente individual através da coluna depende do equilíbrio de distribuição de cada componente entre as fases estacionária e móvel. Portanto, migração diferencial é determinada pelas variáveis experimentais que afetam a distribuição: *composição da fase móvel*, *composição da fase estacionária* e *temperatura de separação*. Em princípio, a pressão dentro da coluna também afeta o equilíbrio de distribuição e a migração diferencial. De fato, efeitos de pressão são desprezíveis a pressões de coluna habituais, isto é, entre 500 a 3000 psi [Snyder e Kirkland, 1979].

A introdução da amostra na coluna leva, se bem executada, menos de um segundo. À primeira vista, a largura de todos os picos deveria ser a do tempo gasto na injeção. Porém, tal fato não ocorre devido a uma série de processos de transporte de matéria, provocado pelas características da fase móvel e pelas propriedades das partículas da fase estacionária (diâmetro, forma física, natureza, eficiência da coluna, tecnologia do empacotamento, espessura, rugosidade da superfície do tubo, etc.). Os picos às vezes se alargam muito, acarretando uma perda da separação e conseqüentemente uma péssima resolução da análise. Entretanto, deve-se notar que, nessa segunda classe de fenômeno (alargamento das bandas), os fatores que regem a migração diferencial não afetam o alargamento da distribuição molecular dentro da coluna; eles afetam somente sua velocidade relativa de movimentação [Ciola, 2000].

2.2. Resolução de Moléculas Racêmicas por Cromatografia Líquida

Devido a grande semelhança observada nas propriedades físicas dos enantiômeros não é possível separá-los um do outro, por métodos tradicionais de separação. Nem por destilação fracionada, pois os respectivos pontos de ebulição são idênticos; nem por cristalização fracionada, devido às solubilidades dos enantiômeros em dado solvente serem idênticas (a menos que o solvente seja opticamente ativo); nem por cromatografia, porque eles são adsorvidos com igual força por um dado adsorvente (a menos que este seja opticamente ativo). A separação dos dois enantiômeros de uma mistura racêmica – ou *resolução* dessa mistura racêmica – constitui, por consequência uma tarefa cuja realização exige um método especial [Morrison e Boyd, 1983].

Os métodos de separação quiral usando técnicas de cromatografia líquida podem ser divididas em duas categorias: uma é o *método indireto*, na qual é baseado na formação de um diastereoisômero pela reação com um reagente quiral. O outro é o *método direto*, no qual é baseado na formação de um diastereoisômero em uma fase estacionária ou em uma fase móvel [Haginaka, 2002].

O método indireto de separação quiral envolve a síntese de diastereoisômeros por uma agente quiral seguido por cromatografia em uma coluna aquiral. O método direto envolve separação de drogas racêmicas em seus correspondentes enantiômeros usando uma fase estacionária quiral. Métodos diretos baseados em FEQs são preferidos já que é um método rápido e satisfatório para resolução de racematos tanto na escala analítica quanto na escala preparativa [Aboul-Enein, 2001]. A Figura 2.2 apresenta as duas possíveis rotas para obtenção de compostos enantiomericamente puros.

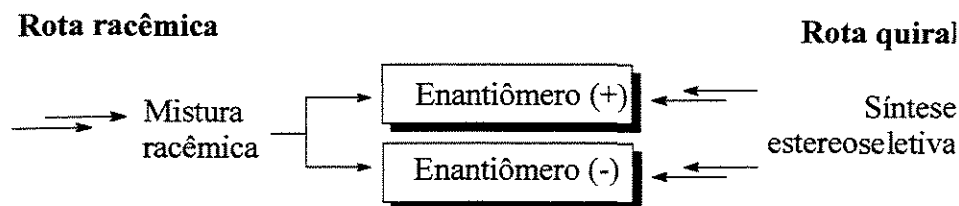


Figura 2.2 – Preparação de enantiômeros (Adaptado de Francotte, 1994).

As principais vantagens das técnicas cromatográficas são: aplicação a uma larga variedade de estruturas racêmicas; ambos enantiômeros são usualmente obtidos; elevado grau de pureza óptica dos enantiômeros isolados; rápida e fácil realização e separação de enantiômeros de misturas racêmicas com características especiais como compostos que não podem ser derivatizados (hidrocarboneto), o qual é facilmente racemizado ou tem um tipo incomum de quiralidade (isto é, quiralidade do tipo helicoidal). Entretanto, como todos os métodos, a rota cromatográfica sofre de certas desvantagens, tais como: alto custo da fase estacionária; alta condição de diluição; consumo de uma larga quantidade da fase móvel e dificuldades associadas ao reciclo da fase móvel. Estes são obstáculos para o escalonamento, mas a uma grande extensão tem sido superado graças a recentes melhorias em técnicas cromatográficas e o desenvolvimento de novas, e relativamente baratas, fases estacionárias quirais para propósitos preparativos [Francotte, 1994].

2.3. Cromatografia Líquida Quiral

A obtenção de enantiômeros puros representa um grande desafio devido às propriedades termodinâmicas dos mesmos. A resolução direta de enantiômeros é possível desde que exista reconhecimento quiral entre a mistura racêmica e o seletor quiral. Este seletor quiral deve associar-se preferencialmente a um dos enantiômeros, e tanto pode estar ancorado à fase estacionária como pode ser um aditivo adicional a fase móvel. No segundo caso, a fase estacionária não precisa ser quiral [Cass e Degani, 2001].

Para que enantiômeros sejam separados cromatograficamente em uma FEQ, duas condições devem ser cumpridas: adsorbatos diastereoisoméricos devem ser formados pela FEQ e pelo menos um dos enantiômeros analitos e estes têm de diferir em suas energias livres de formação. Adsorbatos diastereoisoméricos são formados como resultado de uma ou mais interações atrativas entre a FEQ e o enantiômero analito, pela exclusão do enantiômero analito pela fase móvel ou por difusão passiva do enantiômero analito em uma matriz quiral [Pirkle e Pochapsky, 1989]. As diferenças em estabilidade destes adsorbatos diastereoisoméricos levam a diferentes tempos de retenção dos enantiômeros na coluna. O enantiômero que forma o complexo menos estável elui primeiro. A diferença de energia

livre de formação dos adsorbatos diastereoisoméricos formados deve ter um valor satisfatório para que ocorra separação [Cass e Degani, 2001].

Reconhecimento quiral, em termos cromatográficos, significa interação preferencial de um enantiômero de uma substância com um enantiômero de uma outra. O reconhecimento quiral requer um mínimo de três interações simultâneas entre a FEQ e pelo menos um dos enantiômeros (*three point rule*), com pelo menos uma destas interações sendo estereoquimicamente dependente [Pirkle e Pochapsky, 1989]. O entendimento de como e onde ocorre o reconhecimento quiral por uma molécula seletor quiral pode prover importante informação com respeito à estimativa da magnitude qualitativa da enantioseparação, tipos de analitos separáveis em um determinado seletor, previsibilidade de ordem de eluição e condições cromatográficas apropriadas [Maier *et al.*, 2001].

2.3.1. Fase Estacionária Quiral

2.3.1.1. Histórico

O crédito para a primeira resolução de enantiômeros de uma mistura racêmica foi para Louis Pasteur que, em 1848, separou manualmente os cristais não-idênticos de enantiômeros do amônio tatarato de sódio. Em 1874, Le Bel e Van't Hoff independentemente, propuseram que o átomo de carbono assimétrico seria o responsável pela quiralidade de combinações orgânicas. Le Bel favoreceu um arranjo piramidal quadrado de substituintes ao redor de um átomo de carbono enquanto que Van't Hoff postulou corretamente um arranjo tetraédrico em torno de um átomo de carbono central [Pryde, 1989].

O potencial para separação de enantiômeros através do uso de adsorventes quirais não racêmicos a muito tem sido reconhecido com várias tentativas de adsorção enantiosseletiva sendo informada nos anos vinte do século passado, inclusive a observação de rotação óptica induzida em soluções racêmica de tintas usadas para tingir lã. Estas tentativas foram feitas invariavelmente usando adsorventes poliméricos quirais naturais como lã e celulose ou outros polissacarídeos [Pirkle e Pochapsky, 1989].

Colunas cromatográficas utilizando a lactose como adsorvente foi empregada prosperamente por Henderson e Rule (1939) para a resolução de uma cânfora racêmica e por Prelog e Wieland (1944) para a resolução de base de Tröger [Pryde, 1989].

O uso de polímeros quirais naturais como um adsorvente enantioseletivo tem sido e continua sendo uma rota extensamente utilizada. Tais adsorventes têm com vantagem o baixo custo e ampla disponibilidade e normalmente não necessitam de muito no tempo de preparação. Entretanto, adsorventes biopoliméricos às vezes tendem a ter pobres propriedades mecânicas e cromatográficas. Estes materiais possuem pobre propriedade mecânica e sua alta polaridade e estrutura porosa proporciona um comportamento cinético desfavorável. Uma rota alternativa requer o uso de FEQ sintética preparada para um tipo específico de separação. Esta rota fornece fases estacionárias com boas propriedades mecânicas e cromatográficas. Tentativas para melhorar as propriedades cromatográficas e enantioseletivas da celulose têm se concentrado na derivatização dos grupamentos hidroxilas para diminuir a polaridade do material e prover um aumento na interação entre FEQ e enantiômero analito [Pirkle e Pochapsky, 1989].

2.3.1.2. Tipos de Fases Estacionárias Quirais

As FEQs podem ser classificadas de uma maneira geral como um dos cinco grupos abaixo, dependendo dos processos de reconhecimento quiral que operam durante a separação [Heard e Brain, 1994]:

- Tipo I – Fases do tipo Pirkle;
- Tipo II – Fases com polissacarídeos helicoidais (*Helical polysaccharide phases – HPP*);
- Tipo III – Fases com cavidades quirais (*Chiral cavity phases*);
- Tipo IV – Complexação ternária do ligante;
- Tipo V – Proteínas.

Fase tipo Pirkle

Pirkle (1979) relatou que para resolução quiral acontecer deve haver pelo menos três interações simultâneas entre uma FEQ e um enantiômero soluto, por isso uma ou mais interações devem ser estereoquimicamente dependentes. Interações típicas envolvidas no processo de reconhecimento quiral são interações de tipo π - π , ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo, interações hidrofóbicas e estéricas (Figura 2.3). O entendimento detalhado das interações entre a FEQ e o soluto enantiomérico conduz à possibilidade de prever a ordem de eluição de enantiômeros individuais [Pryde, 1989].

Baseado nos resultados obtidos na primeira geração de fases quirais, Pirkle desenvolveu uma teoria de reciprocidade que diz: “A interação diastereoisomérica que permite a uma coluna derivada de um dado composto quiral *A* resolver uma determinada mistura racêmica *B* também permite à coluna derivada do composto *B* resolver a mistura racêmica *A*”. Este fato levou ao surgimento da segunda geração de fases estacionárias quirais de Pirkle, derivadas de N-(3,5-dinitrobenzoi) aminoácidos (π -ácido, *in nature*) [Cass e Degani, 2001].

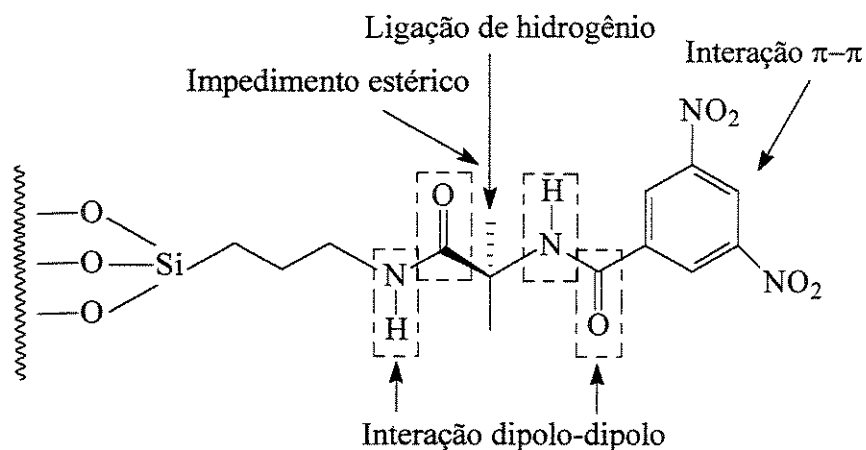


Figura 2.3 – Representação de fase estacionária do tipo Pirkle e as suas interações com o soluto.

A terceira geração de fases quirais de Pirkle (π -básica, *in nature*) foi resultado direto da teoria de reciprocidade [Cass e Degani, 2001]. As fases π -receptor mais frequentemente

utilizadas são derivadas do aminoácido fenilglicina (DNBPG) ou leucina (DNBLeu) covalentemente ou ionicamente ligada ao gel de 3-aminopropilsilica. Estas fases são comercialmente disponíveis tanto para separações analíticas quanto para separações preparativas de enantiômeros [Francotte, 1994].

Fase com polissacarídeos helicoidais (HPP)

Fases do tipo HPP funcionam por uma combinação de reações complementares entre o enantiômero soluto e o polissacarídeo imobilizado, geralmente celulose ou amilose, cujas estruturas são mostradas na Figura 2.4. A enantiodiscriminação é obtida através da formação de complexos de inclusão estereoespecíficas em cavidades quirais que surgem da estrutura helicoidal do polissacarídeo [Heard e Brain, 1994].

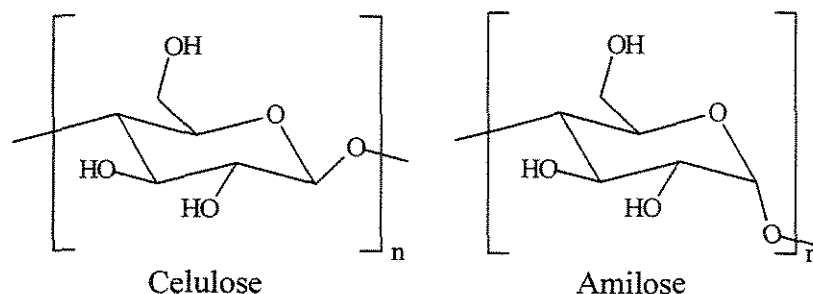


Figura 2.4 – Estrutura química da celulose e amilose.

A celulose e amilose têm fornecido fases estacionárias notavelmente versáteis e extremamente poderosas tanto para fins analíticos como para fins preparativos. É bem estabelecido que a enantioseletividade destas fases varia fortemente com o tipo de grupo derivatizado ligado à molécula de glicose do polissacarídeo. Esta característica tem sido extensivamente explorada para modular a habilidade de reconhecimento quiral destas fases estacionárias baseadas em polissacarídeos [Francotte e Huynh, 2002].

O derivado de celulose mais utilizado para separações em uma escala preparativa é triacetato de celulose microcristalina (MCTA) [Francotte, 1994], no qual é produto da

acetilação heterogênea da celulose microcristalina (Figura 2.5). Sob estas condições, parte da estrutura original do polímero é preservada [Pirkle e Pochapsky, 1989].

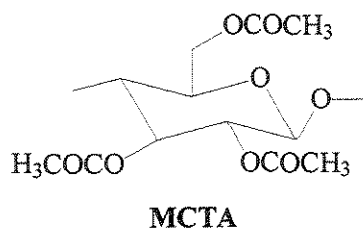


Figura 2.5 – Estrutura do MCTA.

Esta fase estacionária é capaz de separar enantiômeros pertencentes a muitas classes de compostos orgânicos [Okamoto *et al.*, 1984a], incluindo materiais destituídos de substituintes aril e moléculas carentes de grupos reativos, isto é, hidrocarbonetos [Koller *et al.*, 1983].

Hesse e Hegel (1973) foram os primeiros a mostrar a importância da estrutura secundária do MCTA para o poder de separação. Porém, eles diferenciaram o MCTA somente entre estruturas amorfas e estruturas parcialmente ordenadas (cristalina). Eles concluíram que o polímero estruturalmente ordenado é mais efetivo que sua forma amorfa, e que a interação primária entre a matriz do polímero e enantiômeros de baixa massa molecular é a formação de complexos de inclusão [Francotte *et al.*, 1985], onde o mecanismo de reconhecimento quiral proposto por Hesse e Hegel considera a formação de complexos de inclusão entre o enantiômero soluto e as cadeias helicoidais do triacetato de celulose, como apresentado na Figura 2.6 [Pryde, 1989].

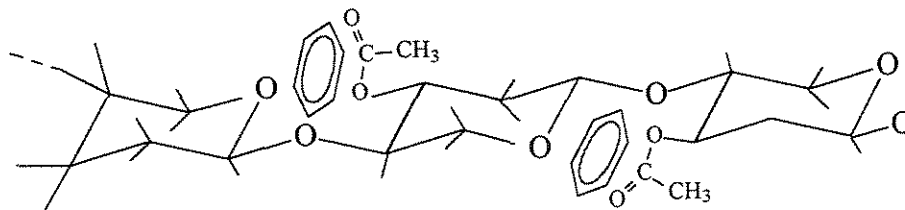


Figura 2.6 – Mecanismo de reconhecimento quiral proposto por Hesse e Hagel.

Hesse e Hagel (1973) também afirmaram que o reconhecimento quiral pelo triacetato de celulose é perdido após recristalização do material, presumidamente pela destruição das cavidades quirais na estrutura helicoidal do polissacarídeo. Como o mecanismo da seleção quiral em colunas de triacetato de celulose não é bem entendida, resolução de racematos em materiais de celulose continua sendo empírica. Entretanto, apesar disto, o material tem sido usado para uma larga faixa de separações em escalas analíticas e preparativas [Pryde, 1989].

Fases com cavidades quirais

Fases do tipo cavidade quiral possuem mecanismo primário de reconhecimento quiral baseado na complexação de inclusão estereoespecífica de uma molécula do soluto em uma molécula de cavidade orientada relativamente grande que é ligado à fase estacionária [Heard e Brain, 1994].

Fases estacionárias do tipo cavidade quiral foram desenvolvidas utilizando ciclodextrinas, os quais são oligossacarídeos cíclicos, produzidos a partir do amido, sob ação de enzimas, e podem ser obtidos contendo de seis a doze unidades de glicose, mas somente aquelas contendo seis (α), sete (β) ou oito (γ) unidades são comercialmente disponíveis (Figura 2.7) [Cass e Degani, 2001]. Ciclodextrina exibe a propriedade de formar complexos de inclusão estáveis nas suas cavidades altamente hidrofóbicas com uma extensa variedade de moléculas. O tamanho das cavidades, na qual diferem para α -, β - e γ -ciclodextrinas, e o substituinte na ciclodextrina representam um importante papel na determinação da habilidade para complexar uma molécula definida [Francotte, 1994], onde a β -cilcodextrina (β -CD) é a ciclodextrina mais aplicada. O arranjo cíclico da β -CD eleva as cavidades quirais nas quais moléculas de diferentes estruturas podem ser incluídas [Carbera e Lubda, 1994].

Inicialmente, fases estacionárias utilizando a ciclodextrina foram desenvolvidas sem nenhuma derivatização. Entretanto, derivatizações com outros grupos, tais como, ésteres, éteres e carbamatos ligados em sílica também se tornaram FEQs de sucesso [Cass e Degani, 2001], os quais apresenta boa performance em uma escala analítica. Aplicações preparativas usando a ciclodextrina como seletor quiral foram implantados em polímeros

obtidos por ligações cruzadas de ciclodextrina com bis(epoxipropil) etilenoglicol e nos materiais de sílica modificada Cyclobond I e ChiraDex [Francotte, 1994].

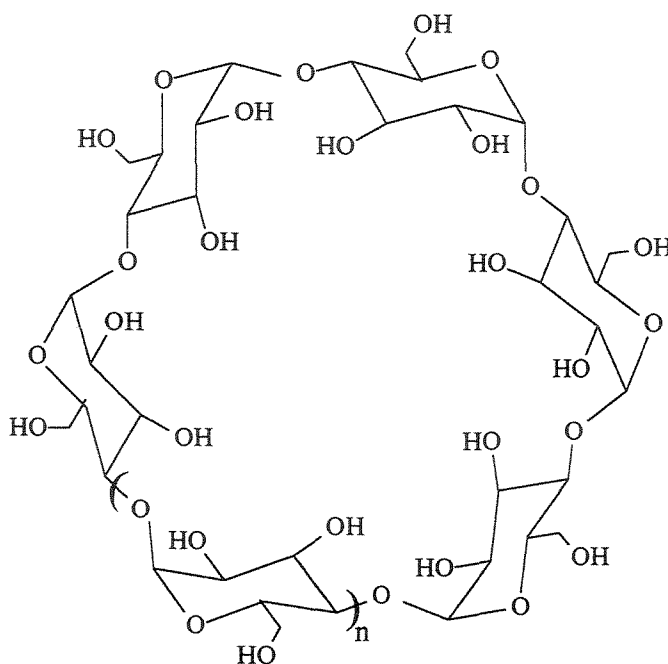


Figura 2.7 – Estrutura das ciclodextrinas α , β e γ (n igual a 1, 2 e 3, respectivamente).

Complexação de ligantes ternários

Fases do tipo IV envolvem a formação de complexos quelatados reversíveis do tipo geral: *ligante quiral* – *íon metálico* – *soluto quiral*. Neste tipo de FEQ o ligante, frequentemente um aminoácido, é ligado à fase estacionária via uma longa cadeia alquil [Heard e Brain, 1994], como mostrado na Figura 2.8.

Modelos desenvolvidos para descrever a enantioseletividade deste tipo de FEQ envolvem a presença de um complexo multicomponente contendo um íon metálico central (normalmente Cu^{2+} ou Ni^{2+}) complexados por duas moléculas quirais bifuncionais quelatadas. Uma ou mais moléculas completam a primeira solvatação esférica do íon metálico. Se os quelatores são aminoácidos, os grupos amino e carboxílicos dos dois quelatores são organizados equatorialmente ao redor do íon metálico de maneira alternada. Se um dos quelatores quirais está ligado a um suporte, a FEQ pode formar adsorbatos

diastereoisoméricos com enantiômeros analitos. As relativas estabilidades dos adsorbatos, se diferentes, conduzem a separações cromatográficas dos enantiômeros analitos. Se a fase estacionária é aquiral, mas um quelator enantiomericamente enriquecido está presente na fase móvel (aditivo quiral de fase móvel), a separação do enantiômero ainda pode ser obtida por particionamento diferencial dos complexos diastereoisoméricos entre a fase estacionária (normalmente um suporte de fase reversa) e a fase móvel [Pirkle e Pochapsky, 1989].

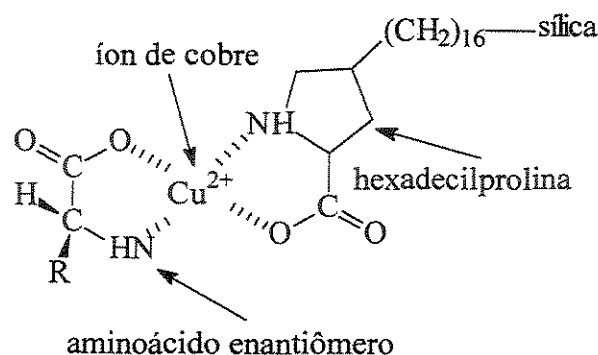


Figura 2.8 – Complexação ternária estereoseletiva.

Proteínas

Uma grande quantidade de FEQs tem sido desenvolvida pela imobilização de proteínas ou enzimas tais como albumina de soro bovino (ASB) ou humano (ASH), glicoproteínas α_1 -ácida e α -quimotripsina em sílica gel. Estas FEQs normalmente operam sob condições de fase reversa [Francotte, 1994]. Nesta classe de FEQ, a separação ocorre devido a interações estereoespecíficas entre o soluto e proteína imobilizada. Desvantagens particulares desta classe de FEQs correspondem à instabilidade com solventes orgânicos e com pH extremos. Além disso, este tipo de fase estacionária possui baixa capacidade e não pode ser utilizado modo preparativo [Heard e Brain, 1994].

2.3.1.3. Fases estacionárias baseadas em polissacarídeos

As FEQs normalmente consistem em pequenas moléculas quirais ou polímeros quirais imobilizados em um suporte como sílica gel. Os polímeros também podem ser usados como gel poroso [Yashima, 2001]. Em sistemas cromatográficos com FEQs de pequenas moléculas, o mecanismo de reconhecimento quiral pode ser estimado através de estudos de espectroscopia na interação entre o composto quiral usado na FEQ e o composto a ser resolvido. Por outro lado, no sistema em que as FEQs forem polímeros, o entendimento do mecanismo de reconhecimento quiral em um nível molecular é usualmente dificultado porque em muitos casos as estruturas estéricas exata dos polímeros não são disponíveis. Entretanto, FEQs poliméricas são interessantes porque seu reconhecimento quiral depende da alta ordem estrutural do polímero [Okamoto *et al.*, 1991], e então é difícil de prever o reconhecimento quiral deles somente a partir de uma unidade monomérica [Okamoto e Kaida, 1994].

Celulose e amilose são os polímeros naturais opticamente mais acessíveis. Estes polissacarídeos mostram reconhecimento quiral, mas não fornecem FEQs de grande utilidade prática. Entretanto, suas derivatizações fornece FEQs com alto reconhecimento quiral que podem separar uma larga faixa de compostos racêmicos em enantiômeros [Okamoto e Kaida, 1994]. Estas FEQs foram estudadas extensivamente como seletores quirais cromatográficos nas duas últimas décadas e, como resultado, elevadas quantidades de FEQs têm sido desenvolvidas e utilizadas em resoluções enantioméricas por CLAE [Haginaka, 2002]. Algumas destas FEQs são disponíveis comercialmente, como apresentado na Tabela 2.1 [Francotte, 2001]. Esta evolução é atribuída principalmente à necessidade de se obter formas enantioméricas opticamente puras de compostos quirais biologicamente ativos.

Os derivados de polissacarídeos, particularmente os carbamatos de celulose e amilose são os mais empregados como FEQs em CLAE. A grande vantagem destas fases quirais, quando comparadas com as fases quirais dos outros tipos, é que uma maior variedade de classes de compostos quirais podem ser eficientemente resolvida [Cass *et al.*, 1997].

Tabela 2.1 – Fases estacionárias baseadas em polissacarídeos mais utilizadas atualmente para separações em escala preparativa

<i>Nome</i>	<i>Nome comercial</i>
Triacetato de celulose microcristalina	MCTA
Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose	Chiralcel OD
Tris(4-metilbenzoato) de celulose	Chiralcel OJ
Tribenzoato de celulose	Chiralcel OB
Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose	Chiralpak AD
Tris[(<i>S</i>)-feniletilcarbamato] de amilose	Chiralpak AS

Tabela adaptada de Francotte, 1994.

A grande versatilidade do MCTA, a capacidade na saturação, seletividade, boa estabilidade mecânica e os baixos custos de preparação, quando comparadas com outras fases quirais, têm contribuído para a extensão do uso deste adsorvente, até mesmo se eles possuem algumas limitações práticas [Francotte, 1994; Miyabe e Guiochon, 1999].

O triacetato de celulose pode ser usado tanto no estado microcristalino expandido (“swollen state”) quanto como uma camada de cobertura em partículas porosas de sílica. Ambos os tipos possuem comportamentos cromatográficos diferentes [Rizzi, 1989a]. O triacetato de celulose no estado microcristalino expandido é obtido pela acetilação heterogênea da celulose microcristalina e subsequente expansão em álcool em ebulição, por exemplo, etanol. É assumida a formação de algum tipo de complexo de inclusão com vários tipos de analitos nas cavidades quirais da fase estacionária microcristalina expandida [Rizzi, 1989b]. Elevada enantioseletividade para muitos grupos de compostos e elevada capacidade na saturação são as principais vantagens deste adsorvente. Entretanto, o grande alargamento das bandas normalmente observado em separações cromatográficas resulta em baixa eficiência e limita o uso deste material para propósitos analíticos [Rizzi, 1989c].

O sucesso do MCTA como fase estacionária quiral foi atribuído à sua própria ordenação estrutural. Seria esperado, por essa razão, que a dissolução do MCTA em um solvente conduziria a uma perda de seu poder de resolução. Contudo, quando o MCTA é depositado em sílica gel em solução, não somente continuou apresentando reconhecimento quiral, mas mostrou diferente resolução quiral [Okamoto *et al.*, 1984b]. Base de Tröger,

por exemplo, em MCTA padrão, o (-)-isômero é eluído primeiro, enquanto que, quando suportado em sílica gel, o (+)-isômero elui primeiro. Resultados semelhantes foram divulgados para outros racematos [Shibata *et al.*, 1986]. Esta mudança no reconhecimento quiral é atribuída a diferentes conformações do triacetato de celulose. Este resultado claramente indica que a habilidade de resolução óptica de FEQs poliméricas depende enormemente de sua elevada ordem estrutural [Okamoto e Kaida, 1994].

O MCTA não é estável em todos os solventes. Metanol, etanol, 2-propanol e misturas destes álcoois com água ou hidrocarbonetos são as fases móveis mais utilizadas. Isto porque a enantioseletividade do MCTA somente é ativada no estado microcristalino expandido [Seidel-Morgenstern e Guiochon, 1993a].

2.3.2. Fase Móvel

Na cromatografia líquida as espécies que estão sendo analisadas sofrem enorme influência da fase estacionária e, ao mesmo tempo, as propriedades destas são continuamente influenciadas pela fase móvel [Ciola, 2000].

As principais características que as fases móveis utilizadas em CLAE devem apresentar são [Guimarães e Collins, 1997]:

- a) ser de alto grau de pureza e de fácil purificação;
- b) dissolver a amostra sem decompor os seus componentes;
- c) não decompor ou dissolver a fase estacionária;
- d) ter baixa viscosidade;
- e) ser compatível com o tipo de detector utilizado;
- f) ter polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra.

Segurança, custo, manipulação após a separação (reciclo e evaporação) são outros fatores que também estão diretamente relacionados com a escolha da fase móvel [Francotte, 2001].

A escolha da fase móvel é ponto crítico para separações de enantiômeros de cunho preparativo, na qual exerce influência direta no rendimento. Parâmetros importantes, tais

como seletividade da separação, tempo de retenção e solubilidade do racemato, apresentam alta sensibilidade com relação às mudanças de composição da fase móvel. Outros parâmetros, como por exemplo, a resolução também pode ser afetada pela fase móvel. Este é o caso particular para fases baseadas em polissacarídeos. Em alguns casos, o impacto da fase móvel é tão forte que mudanças na composição da fase móvel causam uma inversão da ordem de eluição. Por esta razão, antes de executar uma separação preparativa é recomendado estabelecer a ordem de eluição de ambos enantiômeros sob as mesmas condições como as solicitadas para a separação preparativa. Isto pode ser feito por detecção polarimétrica ou por injeção de enantiômeros individuais. Porém, este estudo deve ser interpretado cuidadosamente porque, para alguns compostos quirais, o sinal da rotação óptica pode inverter com a mudança do solvente [Francotte, 2001].

Devido a um grande número de FEQs baseadas em polissacarídeos possuírem maior ou menor solubilidade em solventes orgânicos, uma série de FEQs tem sido imobilizadas através de um tratamento fotoquímico ou térmico das fases cobertas baseadas em polissacarídeos, esquematicamente mostrado na Figura 2.9.

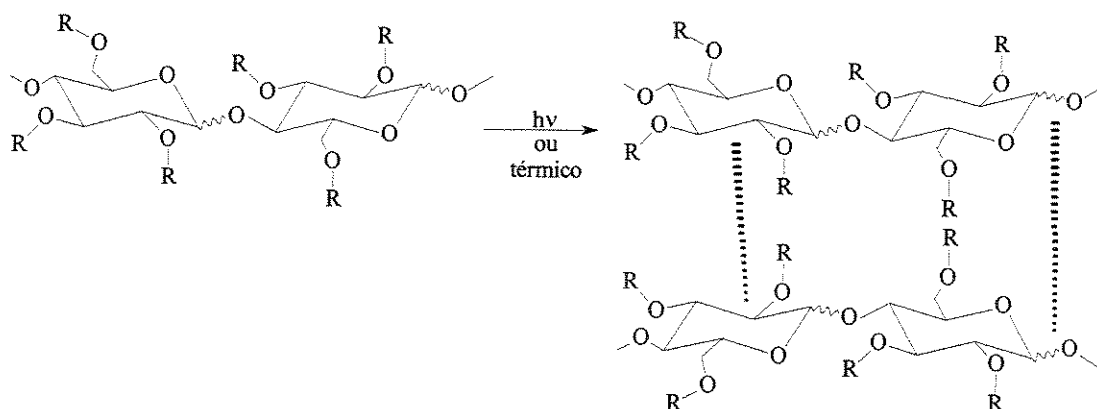


Figura 2.9 – Processo de imobilização de FEQs baseado em polissacarídeos.

Pela simples aplicação de uma destas duas técnicas, a imobilização ocorrerá presumivelmente pela ligação cruzada das cadeias do polissacarídeo o qual, dependendo do tipo de processo térmico ou fotoquímico empregado um será mais eficiente que o outro [Francotte e Huynh, 2002; Francotte, 2001]. Separações cromatográficas dos

enantiômeros da imida tetracíclica em tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) coberta em sílica gel, como exemplo, antes e após imobilização usando fase móvel convencional consistindo em uma mistura de hexano/2-propanol 90/10 (v/v) pode ser mais ou menos resolvido favoravelmente. Entretanto, usando a fase estacionária imobilizada com clorofórmio na fase móvel (heptano/clorofórmio 25/75 (v/v)), um aumento na seletividade é observado, a separação é mais rápida, e a solubilidade da amostra pode ser aumentada de um fator de 300 – 500 [Francotte, 2001].

2.4. Transferência de Massa em Colunas Cromatográficas

2.4.1. Cinética de transferência de massa em colunas cromatográficas

O comportamento de um sistema cromatográfico é governado por três fenômenos básicos e a modelagem de cromatografia de multicomponentes significa associar uma equação matemática a cada um destes fenômenos. Os três fenômenos que governam um sistema cromatográfico são [Schulte *et al.*, 1997]:

- A *termodinâmica de adsorção*, descrito pelas isotermas de equilíbrio as quais fornecem a composição na fase estacionária com relação a composição na fase móvel quando o equilíbrio é atingido, a uma dada temperatura. Para cada FEQ diferente a capacidade de saturação enantioseletiva individual pode ser obtida da isoterma.
- A *hidrodinâmica da coluna*, isto é, as propriedades do fluxo através do meio poroso.
- A *cinética de transferência de massa*.

Os processos cromatográficos podem ser descritos por vários modelos matemáticos, os quais tem sido extensivamente discutido na literatura. O modelo geral da cromatografia consiste em duas equações de balanço de massa para cada componente, um para a fase móvel que escoar através do leito de partículas, a outra para o interior das partículas, envolvendo a fase móvel e a monocamada adsorvida. [Guiochon, 2002].

Para escrever as equações deste modelo, assume-se que [Kaczmarski *et al.*, 2002; Cremasco *et al.*, 2001]:

1. o processo no leito fixo para multicomponentes é isotérmico;

2. a fase móvel é uma solução diluída;
3. a velocidade da fase móvel é constante;
4. o leito é empacotado com partículas de adsorvente porosas, esféricas e de tamanho uniforme;
5. o gradiente de concentração na direção radial do leito é desprezível;
6. existe um equilíbrio local para cada componente entre a superfície porosa e a fase fluída estagnada nos macroporos;
7. o coeficiente de dispersão axial é constante;
8. difusão intraparticular é descrita pela difusão no poro. Para um sistema com isoterma linear, a difusão na superfície, se importante, pode ser agrupado a difusão no poro;
9. transferência de massa externa do líquido para os poros é descrita pela transferência de massa no filme.

Baseado nestas hipóteses as seguintes equações para o modelo geral são obtidas [Guiochon, 2002; Kaczmariski *et al.*, 2002; Cremasco *et al.*, 2001]:

(a) Balanço de massa do componente i na fase móvel

$$\varepsilon \frac{\partial c}{\partial t} + u \frac{\partial c}{\partial z} = \varepsilon D_L \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - (1 - \varepsilon) \frac{6k_f}{D_p} \left(c - q \Big|_{r=R_p} \right) \quad (2.1)$$

onde c é a concentração do soluto na fase móvel dentro das partículas e q é a concentração do soluto nos poros das partículas, z e t são as coordenadas espaciais e de tempo, respectivamente, ε é a porosidade do leito, e u é a velocidade superficial da fase móvel, D_L é o coeficiente de dispersão axial, k_f é o coeficiente de transferência de massa externo, e D_p é difusividade nos poros, r é a coordenada radial e R_p é o raio da partícula.

(b) Balanço de massa do componente i na fase sólida

$$\left[\varepsilon_p - (1 - \varepsilon_p) K_p \right] \frac{\partial q}{\partial t} = \varepsilon_p D_p \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial q}{\partial r} \right) \quad (2.2)$$

onde ε_p é a porosidade das partículas e K_p é a constante de equilíbrio de adsorção linear.

(c) Condições iniciais e de contorno

As condições iniciais e de contorno que descrevem a injeção de um pulso em uma coluna cromatográfica são dadas como se segue:

$$z = 0; \quad 0 \leq t < t_p; \quad c = c_0; \quad (2.3)$$

$$z = 0; \quad t > t_p; \quad c = c_0; \quad (2.4)$$

$$z > 0; \quad t > t_p; \quad c = c_0; \quad (2.5)$$

$$z = L; \quad t > t_p; \quad c = 0; \quad (2.6)$$

$$r \geq 0; \quad t = 0; \quad q = 0; \quad (2.7)$$

$$\left. \frac{\partial q}{\partial r} \right|_{r=0} = 0 \quad (2.8)$$

$$\varepsilon_p D_p \left. \frac{\partial q}{\partial r} \right|_{r=R_p} = \frac{6k_f}{D_p} (c - q|_{r=R_p}) \quad (2.9)$$

onde t_p corresponde ao tempo de injeção de um pulso cromatográfico.

Uma simplificação para o modelo geral, também conhecido como modelo do equilíbrio dispersivo, pode ser obtida assumindo que a transferência de massa entre a fase móvel que escoia através do leito e as partículas é infinitamente rápida [Gritti *et al.*, 2003a; Guiochon, 2002]:

$$\varepsilon_T \frac{\partial c}{\partial t} + (1 - \varepsilon_T) \frac{\partial q}{\partial t} + u \frac{\partial c}{\partial z} = \varepsilon_T D_L \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \quad (2.9)$$

Em casos nos quais as resistências à transferência de massa, embora não seja muito importante, não possam ser desprezadas, é comum o uso do modelo do transporte dispersivo. Este modelo assume que a taxa da variação da concentração na fase estacionária

é proporcional a diferença entre a concentração de equilíbrio do soluto na fase estacionária, q^* (quando em equilíbrio com a concentração na fase móvel) e a atual concentração:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = k_m (q^* - q) \quad (2.10)$$

onde k_m corresponde ao coeficiente de transferência de massa global [Guiochon, 2002; Cherrak *et al.*, 2000].

As condições iniciais e de contorno para um pulso cromatográfico são [Guiochon, 2002; Cherrak *et al.*, 2000]:

$$z = L; \quad t = 0; \quad c = 0; \quad (2.11)$$

$$z = 0; \quad 0 \leq t \leq t_p; \quad c = c_0; \quad (2.12)$$

$$z = 0; \quad t > t_p; \quad c = 0; \quad (2.13)$$

$$z = L; \quad t > 0; \quad \frac{\partial c}{\partial z} = 0; \quad (2.14)$$

2.4.2. Método dos momentos para isothermas lineares

O estudo da taxa de transferência de massa e do equilíbrio de adsorção é importante no entendimento e no projeto de ampliação de escala em processos cromatográficos. A resistência à difusão em partículas adsorventes parece ter um efeito significativo na taxa de adsorção global e conseqüentemente na eficiência de uma separação cromatográfica [Miyabe e Suzuki, 1992].

A análise dos momentos é uma ferramenta usual para determinação dos coeficientes de difusão axial e difusão no poro a partir de experimentos de pulsos cromatográficos. Esta técnica consiste na análise da concentração do soluto como uma função do tempo na saída do leito fixo em resposta a concentração do soluto no pulso na entrada do leito fixo. Para

soluções diluídas, a curva de equilíbrio sólido-líquido pode ser representada por uma reta (Lei de Henry). A inclinação desta reta pode ser determinada pelo primeiro momento de um pulso, no qual está relacionado com o tempo de retenção do soluto. Parâmetros de transferência de massa podem ser obtidos a partir do segundo momento [Cremasco *et al.*, 2001; Miyabe e Suzuki, 1992].

Por definição dos momentos de uma distribuição, o n -ésimo momento do perfil de banda na saída do leito cromatográfico de comprimento $z = L$ é [Guiochon *et al.*, 1994]

$$M_n = \int_0^{\infty} c(t, z = L) t^n dt \quad (2.15)$$

O n -ésimo momento absoluto ou momento normalizado é

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^{\infty} c(t, z = L) t^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, z = L) dt} \quad (2.16)$$

e o n -ésimo momento central é

$$\bar{\mu}_n = \frac{\int_0^{\infty} c(t, z = L) (t - \mu)^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, z = L) dt} \quad (2.17)$$

O primeiro momento absoluto μ é relacionado ao tempo de retenção do pico cromatográfico, e então com a força de ligação (isto é, com a constante de equilíbrio). O segundo momento central é relacionado ao espalhamento do pico. O parâmetro c nas Equações 2.16 e 2.17 corresponde à resposta dos pulsos cromatográficos. Quando o pico apresenta uma forma gaussiana, o segundo momento é igual à variância σ^2 [Arnold *et al.*, 1985a; Arnold *et al.*, 1985b] e podem ser escritos da seguinte forma [Ruthven, 1984]:

$$\mu = \frac{L}{u} \left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \varepsilon_p + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) (1-\varepsilon_p) K_p \right] + \frac{t_0}{2} = \frac{L}{u} \left\{ 1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right\} + \frac{t_0}{2} \quad (2.18)$$

$$\sigma^2 = \frac{2L}{u} \left\{ \frac{D_L}{u^2} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^2 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K k_m} \right\} + \frac{t_0^2}{12} \quad (2.19)$$

onde

$$K = \varepsilon_p + (1-\varepsilon_p) K_p \quad (2.20)$$

e K_p é a constante de equilíbrio de adsorção linear e t_0 correspondem ao tempo de retenção do componente não retido.

2.4.3. Altura equivalente a um prato teórico (HETP)

A quantidade *HETP* mede a eficiência das condições cromatográficas através dos tempos de retenção obtidos e do alargamento de bandas. Este parâmetro é normalmente utilizado para avaliar a performance da coluna, admitindo-se uma escolha adequada das condições [Cass e Degani, 2001]. Pequeno valor de *HETP* significa maior eficiência da coluna e altos valores de número de pratos teóricos N_p . A meta principal em cromatografia líquida é o alcance de pequenos valores de *HETP* para maximizar N_p e elevada eficiência da coluna. Em geral [Snyder e Kirkland, 1979]:

- *HETP* é menor em colunas empacotadas com partículas pequenas, e para baixas taxas de velocidade da fase móvel.
- *HETP* é menor para fases móveis menos viscosas e para altas temperaturas de separação.
- *HETP* é menor para amostras de moléculas pequenas.

Informações acerca da cinética de transferência de massa são obtidas pela análise da dependência da *HETP* com a velocidade superficial da fase móvel (u). Geralmente é assumido que transferência de massa em colunas cromatográficas consiste em vários

processos e que a *HETP* total é aditiva. Os quatros processos principais normalmente considerados são: (1) dispersão axial; (2) transferência de massa do fluido para partícula; (3) difusão intraparticular; e (4) adsorção/desorção [Miyabe e Guiochon, 2000].

A altura equivalente a um prato de teórico depende de vários processos que ocorrem durante eluição cromatográfica de uma amostra. Uma expressão simples para altura equivalente a um prato de teórico, conhecido como equação de Van Deemter, tem a forma:

$$HETP = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (2.21)$$

onde *HETP* é altura equivalente a um prato, *u* é velocidade linear da fase móvel, e *A*, *B* e *C* são constantes cinéticas determinadas experimentalmente. *A*, *B* e *C* incluem os efeitos de dispersão axial, transferência de massa fluido-sólido e distribuição não ideal do líquido ao redor do material empacotado [Doran, 1998].

A Figura 2.10 mostra a variação da altura dos pratos com a velocidade superficial da fase móvel.

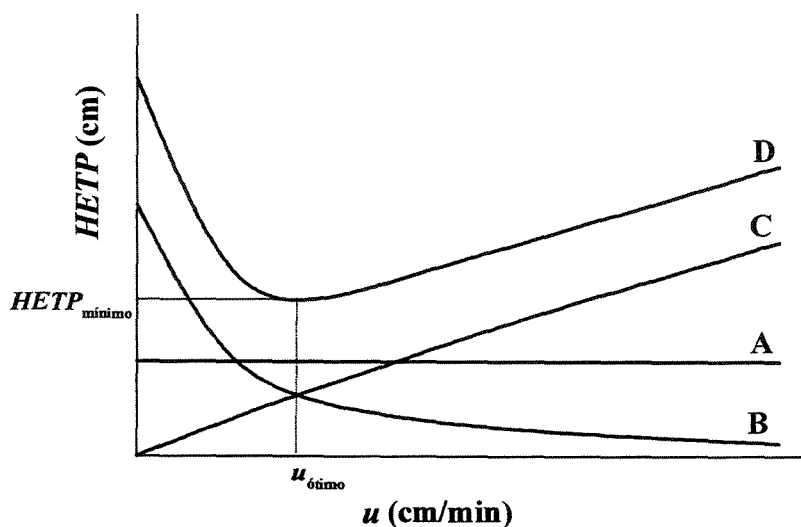


Figura 2.10 – Variação de número de pratos teóricos com a velocidade superficial da fase móvel de acordo com a equação de Van Deemter.

De acordo com a Equação 2.21 a dispersão axial, representado pela curva A, é independente da velocidade superficial. A dispersão devido à transferência de massa incompleta é uma função linear da velocidade superficial e é representada pela curva C. A dispersão longitudinal é inversamente proporcional a velocidade superficial e é representado pela curva B. A curva D representa o perfil resultante de *HETP* versus *u* [Krijgsman, 1995].

A curva D apresenta um valor mínimo para altura dos pratos (*HETP*_{mínimo}) a uma dada velocidade superficial ótima (*u*_{ótimo}). Abaixo desta velocidade, *HETP* é fortemente dependente dos efeitos de difusão (termo *B*) e a altas velocidades é fortemente dependente do termo de transferência de massa (termo *C*) [Sewell e Clark, 1987].

Para um sistema com isoterma de adsorção linear, a eficiência da coluna cromatográfica pode ser avaliada *HETP*, como se segue [Guiochon *et al.*, 1994]:

$$HETP = \frac{L}{N_p} = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L \quad (2.22)$$

onde *N_p* corresponde ao número de pratos teóricos e *L* é o comprimento da coluna. As Equações 2.18 e 2.19 podem ser combinadas com a Equação 2.22, resultando em

$$HETP = \frac{2D_L}{u} + 2u \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{Kk_m} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \quad (2.23)$$

onde

$$\frac{1}{k_m} = \frac{d_p}{6k_f} + \frac{d_p^2}{60\varepsilon_p D_p} \quad (2.24)$$

e *d_p* corresponde ao diâmetro da partícula adsorvente.

Quando um fluido escoar através dos espaços vazios do leito empacotado, existe a tendência a ocorrer uma mistura axial contribuindo para o alargamento das bandas cromatográficas [Suzuki, 1990; Duan *et al.*, 1998]. Usualmente é assumido que a dispersão axial resulta de dois mecanismos diferentes, difusão molecular axial e difusão

turbilhonar [Guiochon *et al.*, 1994]. Em uma primeira aproximação estes efeitos são aditivos de forma que o coeficiente de dispersão deve ser representado por

$$D_L = \gamma_1 D_m + \gamma_2 d_p u \quad (2.25)$$

onde d_p é o diâmetro da partícula, D_m é o coeficiente de difusão molecular, γ_1 e γ_2 são constantes no qual normalmente possuem valores entre 0,7 e 0,5, respectivamente [Ruthven, 1984]. A contribuição da difusão molecular axial (o primeiro termo da Equação 2.25) para a dispersão axial geralmente é desprezível quando comparado com o segundo termo. Neste caso, a seguinte equação modificada de Van Deemter é derivada da Equação 2.21 [Miyabe e Guiochon, 2000]:

$$HETP = A + Cu \quad (2.26)$$

com

$$A = 2\gamma_2 d_p \quad (2.27a)$$

$$C = 2 \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{Kk_m} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \quad (2.27b)$$

2.5. Isotermas de Adsorção

A relação entre a quantidade adsorvida e a concentração, na fase móvel, a temperatura constante, é chamada de isoterma de adsorção [Sewell e Clarke, 1987].

Isotermas de adsorção têm atraído grande atenção como ferramenta fundamental para investigação de processos físicos envolvidos na retenção cromatográfica. O significado da isoterma de adsorção, neste contexto, é que descreve quantitativamente a distribuição do equilíbrio entre as duas fases envolvidas nos processos cromatográficos sobre uma larga faixa de concentração. Assim, um exame amplo das isotermas de adsorção rende

informações à cerca do solvente, do soluto e do adsorbato como também as interações entre estas espécies que acontece durante a adsorção [Jacobson *et al*, 1984].

Isotermas de equilíbrio de adsorção relacionam a quantidade de excesso de adsorbatos perto de uma superfície e os potenciais químicos deste adsorbatos no seio do fluido e na redondeza da superfície. Representações gráficas de isotermas não são sempre lineares, mas divergem de um comportamento linear por uma variedade de razões, principalmente relacionados à saturação e heterogeneidade da superfície ou para interações adsorbato-adsorbato no seio do fluido ou perto da superfície [James *et al*, 1999].

Os sistemas cromatográficos onde a relação entre a concentração do soluto na fase estacionária (q) e a concentração do soluto na fase móvel (c) são lineares podem ser chamados de *cromatografia linear* (Figura 2.11a). Em cromatografia de adsorção, é comum encontrar uma isoterma de adsorção que é côncava para o eixo c (frequentemente referido como isoterma do tipo Langmuir – Figura 2.11b). Este comportamento surge quando há interações fortes entre o soluto e a fase estacionária, mas as interações de soluto-soluto são relativamente fracas. Inicialmente, a quantia de soluto adsorvido sobre a fase estacionária aumenta rapidamente como a concentração na fase móvel é aumentada até que uma monocamada de moléculas de soluto é formada no adsorvente. Porque as interações entre moléculas de soluto são fracas, a adsorção cessa com a formação da monocamada e a quantia adsorvida permanece constante embora a concentração na fase móvel aumente com o passar do tempo. Conseqüentemente, o coeficiente de distribuição k_d é grande a baixos valores de c , mas diminui com aumento de c . Em sistemas de partição, a isoterma é usualmente convexa para o eixo c (uma isoterma do tipo anti-Langmuir – Figura 2.11c). Este tipo de isoterma surgiu quando as interações entre moléculas do soluto são fortes, mas essas interações entre o soluto e a fase estacionária são relativamente fracas. Assim, a baixas concentrações, a solubilidade das moléculas do soluto é baixa e possui baixos valores de k_d , mas algumas moléculas do soluto são dissolvidas na fase estacionária, as fortes interações soluto-soluto atraem moléculas para a fase estacionária e valores de k_d crescem rapidamente [Sewell e Clarke, 1987].

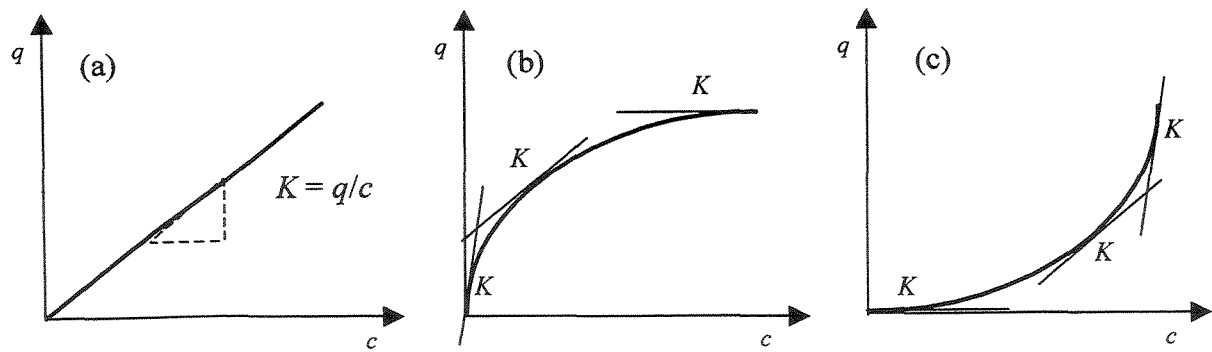


Figura 2.11 – Tipos de isothermas de adsorção: (a) isoterma de adsorção linear; (b) isoterma do tipo Langmuir; (c) isoterma do tipo anti-Langmuir. K representa o coeficiente de distribuição do soluto.

2.5.1. Modelos de isothermas de adsorção

Modelo de Langmuir

O modelo de Langmuir (L) considera que o processo de adsorção acontece em uma superfície composta de um número fixo de sítios de adsorção de igual energia, uma molécula sendo adsorvida por sítio até que a cobertura da monocamada seja alcançada [James *et al.*, 1999]. Este modelo é o mais frequentemente usado no estudo de equilíbrio sólido-líquido, apesar de sua natureza semi-empírica. O modelo é escrito da seguinte forma [Gritti *et al.*, 2003b]:

$$q = \frac{ac}{1 + bc} \quad (2.28)$$

onde a e b são parâmetros da isoterma e a capacidade de saturação q_s é a relação entre a e b .

O modelo de Langmuir tem sido amplamente utilizado para correlacionar dados obtidos em experimentos de adsorção sólido-líquido. Porém, o modelo foi criticado por causa de sua restrição a superfícies homogêneas e cobertura da monocamada. Todavia, a isoterma de Langmuir é conveniente para análise quantitativa de processos de adsorção e

têm uma base física, distintamente de tais equações empíricas como o modelo de Freundlich que não tem nenhuma justificativa teórica significativa [Jacobson, 1984]. A grande vantagem deste modelo é o pequeno número de parâmetros requeridos e a simplicidade de sua derivação. De fato, somente três parâmetros são necessários para descrever adsorção competitiva: duas constantes de equilíbrio e a capacidade de saturação [Cavazzini *et al.*, 2002].

Modelo Freundlich

De interesse particular por causa de seu uso difundido em sistemas sólido – líquido é a isoterma de Freundlich, descrita pela relação:

$$q = K_F c^n \quad (2.29)$$

onde K_F e n são constantes características particulares de cada sistema de adsorção. Se a adsorção é favorável $n > 1$; se a adsorção é não favorável $n < 1$. A isoterma de Freundlich é aplicada a uma larga variedade de antibióticos, hormônios e esteróides [Doran, 1998].

Modelo de Tóth

O modelo de Tóth (T) (Eq. 2.30) considera a superfície de adsorção heterogênea. O grau desta heterogeneidade é descrito pelo parâmetro de heterogeneidade, ν , com $0 \leq \nu \leq 1$, $\nu = 1$ indicando uma superfície completamente homogênea (ambos os modelos LF e T reduz então a isoterma L) [Cavazzani *et al.*, 2002]. Este modelo assume que o parâmetro de heterogeneidade é o mesmo para ambos enantiômeros, o que significa que a FEQ é igualmente heterogênea com respeito aos enantiômeros [Kaczmarski *et al.*, 2002; Gritti *et al.*, 2003b].

$$q_i = \frac{ac}{[1 + (bc)^\nu]^{\frac{1}{\nu}}} \quad (2.30)$$

Modelo de Langmuir - Freundlich

Assim como o modelo de Tóth, o modelo de Langmuir – Freundlich (LF) também introduz o parâmetro de heterogeneidade, v , conforme a Equação 2.31:

$$q_i = \frac{ac^v}{1 + bc^v} \quad (2.31)$$

O modelo LF sugere diferenças no mecanismo de reconhecimento quiral para dois enantiômeros. O principal inconveniente da isoterma LF é que possui uma constante de Henry infinita, conseqüentemente prediz um tempo de retenção infinito para diluição infinita [Cavazzani *et al.*, 2002].

2.5.2. Métodos de Determinação de Isotermas de Adsorção em Colunas

Isotermas têm sido medidas tradicionalmente por métodos estáticos, na qual a mudança na concentração do soluto com relação ao adsorvente e a solução é medida e pontos discretos na isoterma são calculados a partir destas medições. As desvantagens primárias para esta técnica são a lentidão e incertezas no equilíbrio alcançando e as grandes quantidades de soluto e adsorvente requeridas para medidas precisas [Jacobson, 1984].

Métodos dinâmicos são implementações dedicadas à cromatografia os quais foram projetados para facilitar a solução de problemas inversos por uma seleção de condições limites convenientes. Foram desenvolvidos vários métodos durante os últimos 50 anos, inclusive *análise frontal* (AF), *análise frontal por pontos característicos* (AFPC), *eluição por pontos característicos* (EPC), *métodos de máximos de pico*, e *métodos de perturbação*. Os mais convencionais são AF, AFPC e EPC. O método AF pode ser usado para a determinação de isotermas de um único componente e isoterma competitivas. EPC e FACP somente são usadas para determinação de isotermas de um único componente [James *et al.*, 1999].

Análise Frontal

Entre os vários métodos cromatográficos disponíveis para se determinar isotermas de um único componente, o da *análise frontal* é o mais comumente utilizado por causa de sua precisão e relativa simplicidade. Este método tem sido aplicado para determinação de um grande número de isotermas de equilíbrio, em muitos modos de cromatografia [Gritti *et al.*, 2003a; Guiochon *et al.*, 1994].

Análise frontal é um método que consiste em substituir rapidamente, em sucessivos passos, o fluxo de fase móvel que escoar pela coluna por soluções do componente em estudo com concentrações crescentes e o registro das curvas de ruptura à saída de coluna. A Figura 2.12 apresenta um desenho esquemático de uma curva de ruptura para determinação da concentração de equilíbrio na fase estacionária pelo método da análise frontal [Gritti *et al.*, 2003a; Gritti *et al.*, 2003b].

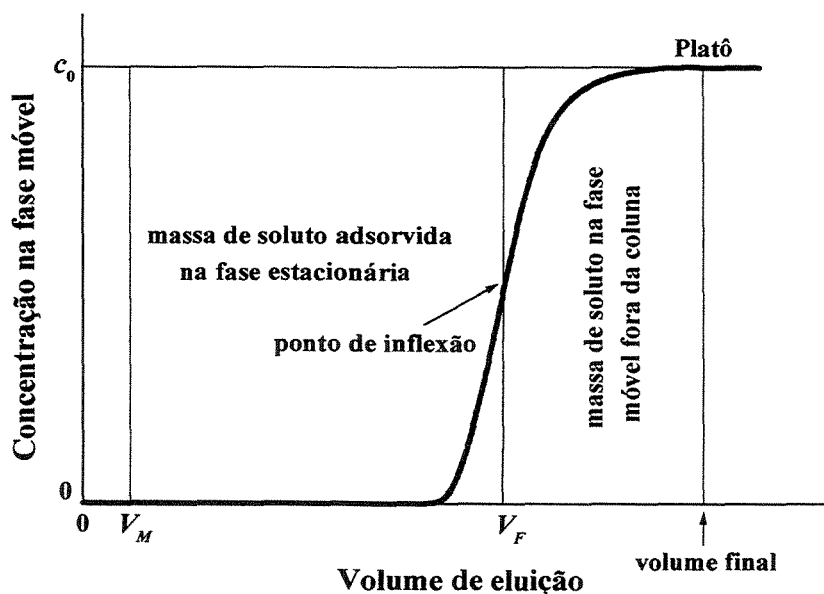


Figura 2.12 – Método da análise frontal para determinação da concentração de equilíbrio na fase estacionária. A curva de ruptura é representada pela linha sólida. (Figura adaptada de Gritti *et al.*, 2003a).

O balanço de massa do soluto entre o tempo em que a nova solução entra na coluna e quando o novo platô é alcançado fornece a quantidade adsorvida, q , do soluto na fase estacionária em equilíbrio com uma dada concentração da fase móvel, c , de acordo com a Equação 2.32,

$$q = \frac{c(V_F - V_0)}{V_a} \quad (2.32)$$

onde V_F é o volume de retenção do ponto de inflexão na curva de ruptura, V_0 é o volume morto do sistema (incluindo o volume de vazios da coluna), e V_a é o volume do adsorvente na coluna [Gritti *et al.*, 2003b; Cherrak *et al.*, 2000; Jacobson *et al.*, 1984].

Para isotermas de adsorção competitivas, a quantidade adsorvida de cada enantiômero na mistura é determinada pela equação:

$$q_{i+1} = q_i + \frac{(c_{i+1} - c_i)(V_{F,i+1} - V_0)}{V_a} \quad (2.33)$$

onde q_i e q_{i+1} são as quantidades adsorvidas pela fase sólida após o i -ésimo e o $(i$ -ésimo + 1) passos, quando em equilíbrio com a concentração c_i e c_{i+1} , respectivamente, $V_{F,i+1}$ é o volume de retenção do ponto de inflexão da $(i$ -ésima + 1) curva de ruptura, V_0 é o volume morto do sistema e V_a é o volume do adsorvente na coluna [Guiochon *et al.*, 1994; Jacobson *et al.*, 1984].

A quantidade adsorvida durante cada passo da corrida na AF também pode ser calculada pela equação do balanço de massa integrada:

$$t_r = t_0 \left[1 + F \frac{q(c_E) - q_0(c_0)}{c_E - c_0} \right] \quad (2.34)$$

onde $q_0(c_0)$ é a quantidade adsorvida no equilíbrio após o passo de mudança de concentração c_0 para concentração c_E na entrada da coluna, e t_0 é o tempo de retenção do componente não retido e F é a relação $(1 - \varepsilon_T)/\varepsilon_T$. A Equação 2.34 permite a determinação do

ponto da isoterma, $q(c_E)$, a partir do tempo de retenção da frente da curva de ruptura, t_r [Seidel-Morgenstern e Guiochon, 1993a].

Para isotermas de componentes individuais, uma série de pontos é obtida diretamente da integração de sucessivas curvas de ruptura de soluções com concentrações crescentes. Esta integral é diretamente proporcional à quantidade de soluto adsorvido na fase estacionária em equilíbrio com a correspondente solução. Para isotermas de multicomponentes, as curvas de ruptura também podem ser usadas, mas com algumas restrições. A curva de ruptura de uma mistura binária tem duas ondas separadas por um platô intermediário. Se as condições iniciais para uma curva de ruptura são que a coluna está em equilíbrio com uma concentração finita de alimentação, o tempo de eluição destas duas ondas depende desta concentração inicial. Assim, ou é necessário determinar a composição da solução eluente da coluna durante o platô intermediário ou adotar como condição de inicial o equilíbrio com a fase móvel pura, neste caso somente o componente puro menos retido é eluído durante o platô intermediário. [Mihlbachler *et al.*, 2002].

AF é o único método cromatográfico que permite medidas de isoterma convenientes e precisas quando a eficiência de coluna é baixa. Isto é em grande parte devido à formação de um alto estreitamento da frente da curva de ruptura sobre a influência de uma termodinâmica de equilíbrio de fase não linear. Este efeito causa a declividade da frente da curva de ruptura o qual aumenta com concentrações crescentes. Uma outra vantagem deste método é que o volume de injeção não é tão grande, sendo um importante fator na determinação dos coeficientes de transferência de massa e que habilita a investigação de uma possível dependência da declividade dianteira na concentração ao lado do efeito do alto estreitamento das curvas de ruptura devido a uma isoterma não linear [Rearden *et al.*, 1998].

Análise Frontal por Pontos Característicos

Em AFPC (Figura 2.13), a isoterma é determinada a partir do perfil difusivo obtido substituindo um fluxo de solução de soluto na fase móvel por um fluxo de fase móvel puro ou, reciprocamente, um fluxo de fase móvel puro por um fluxo de uma solução de soluto [Golshan-Shirazi *et al.*, 1988].

Cada ponto da isoterma a concentração é derivado do volume do efluente, V , do ponto característico do perfil difusivo, a mesma concentração, c na fase móvel [Golshan-Shirazi *et al.*, 1988]. O balanço de massa pode ser escrito da seguinte forma:

$$q = \frac{1}{V_a} \int_0^c (V - V_0) dc \quad (2.35)$$

onde q é a quantidade do componente adsorvido pela coluna quando no equilíbrio com a concentração c e V_a é o volume de adsorvente na coluna [Guiochon *et al.*, 1994].

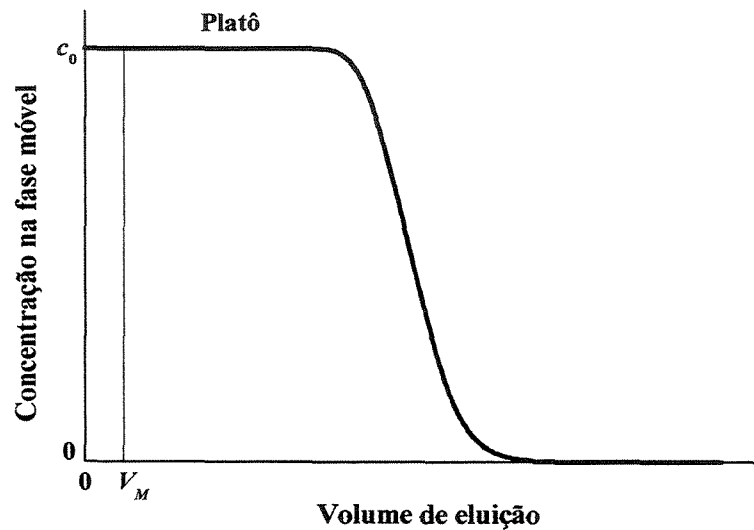


Figura 2.13 – Cromatograma típico obtido na determinação de isothermas de equilíbrio pelos métodos da análise frontal através de pontos característicos (AFPC).

Considerando que o sinal do detector deva ser convertido em unidades de concentração para avaliar Equação 2.35, a calibração do detector é necessária. Outra desvantagem potencial de AFPC é que nenhuma correção é feita para responder pelo alargamento das bandas, o qual alargará e difundirá o limite da frente da curva de ruptura. O método de AF, desde que depende apenas de medidas precisas do tempo de retenção do

auto estreitamento da frente da curva de ruptura, é menos propenso a erro desta natureza [Jacobson *et al.*, 1984].

Eluição por Pontos Característicos

O método EPC é a técnica experimental mais simples. Um grande pulso da amostra é injetado e seu perfil de eluição é registrado. A isoterma é calculada usando a Equação 2.35 [Golshan-Shirazi *et al.*, 1988]. Um cromatograma típico obtido por este método é mostrado a seguir pela Figura 2.14.

O método ECP é idêntico ao método FACP, exceto que uma quantia limitada de soluto é injetada tal que resulta um pico de eluição, em lugar de uma diminuição de concentração de um platô. A vantagem desta técnica é a pequena quantidade de amostra requerida, mas tem as mesmas desvantagens que FACP, também necessitando de uma calibração prévia do detector [Jacobson *et al.*, 1984].

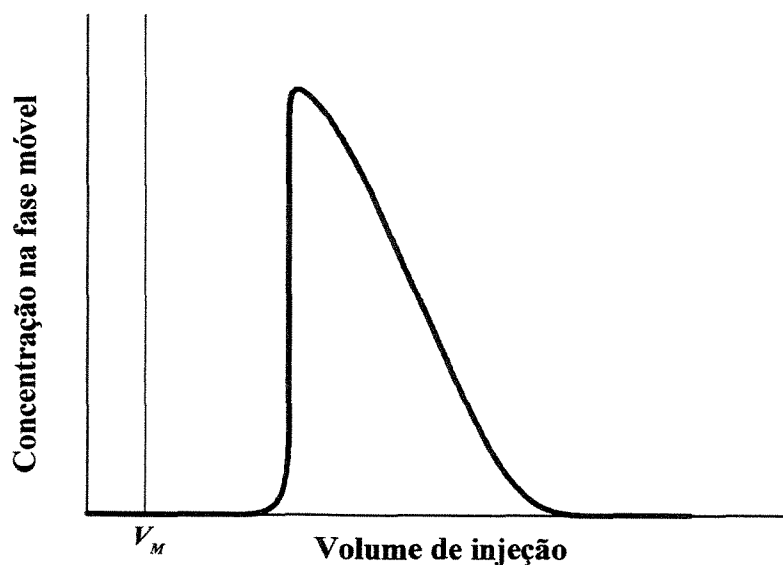


Figura 2.14 – Cromatograma típico obtido na determinação de isothermas de equilíbrio pelo método da eluição através de pontos característicos (EPC).

2.5.3. Sobrecarga da coluna

Os perfis de eluição em condições de sobrecarga são muito sensíveis às isothermas de adsorção [Guiochon *et al.*, 1994]. Em altas concentrações, as bandas cromatográficas são fortemente influenciadas pela termodinâmica de equilíbrio de fase, isto é, a influência do comportamento não linear da isoterma de adsorção possui uma forte predominância com relação à influência da cinética de transferência de massa [Seidel-Morgenstern e Guiochon, 1993]. Estudos realizados para a separação cromatográfica da base de Tröger associaram o comportamento apresentado pelos seus enantiômeros ao modelo de isoterma de adsorção [Seidel-Morgenstern e Guiochon, 1993; Mhlbachler *et al.*, 2002].

Capítulo 3

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo, são apresentadas as descrições dos materiais e a metodologia empregada para a realização dos experimentos. A metodologia foi dividida em dois tópicos: *i)* experimentos com soluções diluídas para as determinações de parâmetros hidrodinâmicos, de transferência de massa e de equilíbrio de adsorção linear; e *ii)* experimentos com soluções concentradas para obtenção das isothermas de adsorção e estudo da sobrecarga na coluna.

3.1. Materiais

3.1.1. A cetamina

A *cetamina* [cloridrato de DL-2-(O-clorofenil)-2-(metilamino) ciclohexano] é uma droga que tem rápida ação sobre o sistema nervoso central [Wannmacherl, 1998] e que induz anestesia dissociativa, isto é, estado de sedação e amnésia durante o qual o paciente, embora possa parecer desperto, está dissociado do ambiente [Yanagihara *et al.*, 2000; Kokolkovas, 1995]. Este fármaco tem se mostrado útil em procedimentos diagnósticos e cirurgias superficiais de curta duração que precisam de intensa analgesia (como a troca de curativos em grandes queimaduras) [Wannmacherl, 1998].

A cetamina, a qual é comercializada sob a forma de racemato [Svensson e Gustafsson, 1996], apresenta potência distintas entre os enantiômeros. *S*-cetamina é cerca de quatro vezes mais potente em analgesia que a *R*-cetamina [Yanagihara *et al.*, 2000]. Os

efeitos da cetamina sobre o sistema nervoso central estão intimamente relacionados com a sua potente ação analgésica e com sua propensão à produção de sonhos e alucinações [Silva, 1998] onde estes efeitos colaterais são atribuídos ao isômero *R* quando a droga é administrada sob a forma de racemato [Nishizawa *et al.*, 2000]. A Figura 3.1 apresenta a estrutura química da cetamina.

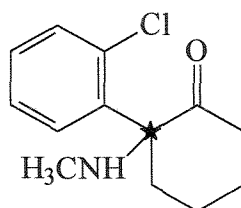


Figura 3.1 – Estrutura química da cetamina. O símbolo (★) representa o centro de quiralidade da molécula da cetamina.

A cetamina utilizada neste trabalho foi gentilmente fornecida pela Cristália Indústrias Farmacêuticas (Itapira, SP) tanto na forma de mistura racêmica quanto na forma pura de seus enantiômeros.

3.1.2. O adsorvente (Triacetato de Celulose Microcristalina – MCTA)

O MCTA foi adquirido da empresa Macherey – Nagel principalmente devido ao seu baixo custo, em comparação com outras fases estacionárias quirais, e sua ampla aplicabilidade.

O adsorvente apresenta uma distribuição do tamanho de partículas entre 15 e 25 μm (diâmetro médio de 22 μm) e foi empacotado (5,60 g de adsorvente) em uma coluna de aço inoxidável (20 x 0,77 cm) pela técnica slurry, utilizando metanol como impulsor. Anteriormente ao empacotamento, o MCTA foi ativado pelo aquecimento em etanol por cerca de 30 min. Após o aquecimento e decantação, a suspensão foi tratada em um banho

ultrasônico COLE PARMER 8892 por 5 minutos a temperatura ambiente, de acordo como apresentado por Seidel-Morgenstern e Guiochon (1993).

3.1.3. Aparelhagem experimental

Todos os experimentos cromatográficos foram realizados em um sistema de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) WATERS 1525, equipado com controle de temperatura (temperatura mínima de trabalho igual a 30°C), detector UV WATERS 2487 e sistema de aquisição de dados computadorizado (software BREEZE). Para os experimentos realizados a temperaturas inferiores à 30°C utilizou-se um banho termostático NESLAB RTE 110. A Figura 3.2 apresenta o sistema de CLAE utilizado na realização dos experimentos.

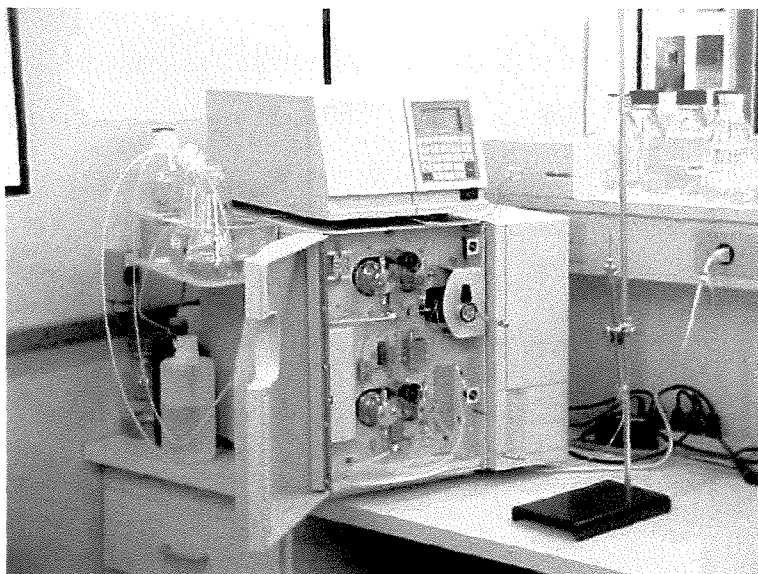


Figura 3.2 – Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado na realização dos experimentos.

Para a determinação das curvas de ruptura múltiplas foram utilizados um sistema de coleta das amostras (Pharmacia Biotech FRAC – 100) e um espectrofotômetro (DU 650 BECKMAN) para análise das mesmas.

3.2. Métodos

3.2.1. Experimentos com soluções diluídas – método dos momentos

Caracterização da coluna - determinação das porosidades

Experimentos de pulsos cromatográficos com o tri-*terc*-butil benzeno (TTBB) e a dextrana azul foram realizados com a finalidade de se verificar a homogeneidade do empacotamento e determinar a porosidade total da coluna (ϵ_T) e do leito (ϵ), respectivamente. O TTBB é uma molécula relativamente pequena (M.M.: 264,44 g/gmol) e não é retida em MCTA sendo capaz de se difundir não somente através do leito mas também nos interstícios das partículas do sólido poroso. A dextrana azul por ser uma molécula de alta massa molecular (M.M.: 2 000 000 g/gmol) e também não retida em MCTA sendo capaz de se difundir apenas através do leito.

O TTBB e a dextrana azul foram previamente dissolvidos na própria fase móvel (etanol anidro) e soluções de 1,0 g/L foram preparadas. Pequenos pulsos cromatográficos (20 μ L) destas soluções foram injetadas na coluna sob condições isocráticas, após um período de tempo necessário para a estabilização do sistema, a diferentes vazões de alimentação da fase móvel (0,2 a 1,0 mL/min). A temperatura do sistema foi mantida constante e igual à 30°C (\pm 1°C). As respostas dos pulsos foram monitoradas pelo detector UV no comprimento de onda a 254 nm.

Os valores das porosidades total e do leito foram determinados a partir da análise do primeiro momento. Os primeiros momentos foram obtidos pela integração das respostas dos pulsos cromatográficos experimentais, de acordo com a Equação 2.15. Sendo o TTBB e a dextrana azul inertes, o termo relativo a adsorção na Equação 2.17 foi desprezado e as porosidades total e do leito obtidas pela inclinação das retas entre os primeiros momentos e o inverso das velocidades superficiais do fluido, como apresentado pela Equação 3.1.

$$\mu = \frac{L}{u} \left[1 + \left(\frac{1-\epsilon}{\epsilon} \right) \epsilon_p \right] + \frac{t_0}{2} = \frac{L}{u} \epsilon_T + \frac{t_0}{2} \quad (3.1)$$

O valor da porosidade do leito obtido experimentalmente foi comparado com o valor estimado utilizando-se a correlação proposta por **Ruthven (1984)**, representada pela Equação 3.2. A porosidade da partícula foi estimada utilizando a Equação 3.3.

$$\varepsilon_T = 0,45 + 0,55\varepsilon \quad (3.2)$$

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p \quad (3.3)$$

Separação cromatográfica com elevação da temperatura

Para o estudo da separação cromatográfica da cetamina racêmica com variação na temperatura foi preparada uma solução da mistura racêmica em etanol anidro com concentração de 1,5 g/L. Pequenos pulsos cromatográficos (20 μ L) foram injetados na coluna, sob condições isocráticas a uma vazão da fase móvel igual a 1,0 mL/min. Os cromatogramas para a cetamina racêmica foram obtidos às temperaturas de 10, 20, 25, 30, 40 e 50°C ($\pm 1^\circ$ C). As respostas foram monitoradas a 254 nm. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Parâmetros cromatográficos de separação

Soluções de 2,0 g/L para ambos os enantiômeros da cetamina e de 1,0, g/L para o TTBB foram preparadas em etanol anidro. Pequenos pulsos cromatográficos (20 μ L) destas soluções foram injetados a diferentes vazões de alimentação da fase móvel (0,2 a 1,0 mL/min) nas temperaturas de 25, 30, 40 e 50°C ($\pm 1^\circ$ C). As respostas foram monitoradas pelo detector UV no qual foi fixado o comprimento de onda em 254 nm..

Os fatores de capacidade (k) e seletividade (α) do sistema foram determinados a partir dos tempos de retenção dos enantiômeros da cetamina (t_r) e do TTBB (t_0), de acordo com as Equações 3.4 e 3.5,

$$k_i = \frac{t_{r,i} - t_0}{t_0} \quad (3.4)$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (3.5)$$

onde k é o fator de capacidade, α é a seletividade, t_r é o tempo de retenção do analito e t_0 é o tempo de retenção do componente não retido.

.....

Constantes de equilíbrio de adsorção linear, coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa global

Os experimentos realizados para a determinação dos parâmetros cromatográficos de separação foram utilizados na obtenção das constantes de equilíbrio de adsorção linear, os coeficientes de dispersão axial e parâmetros de transferência de massa.

As constantes de equilíbrio de adsorção foram determinados utilizando um procedimento similar ao descrito para obtenção das porosidades. Os primeiros momentos para os enantiômeros da cetamina foram obtidos pela integração das respostas dos pulsos cromatográficos experimentais, de acordo com a Equação 2.15. A partir das inclinações das retas obtidas entre os valores calculados para o primeiro momento e o inverso da velocidade superficial foram determinados os valores das constantes de equilíbrio de adsorção, de acordo com a Equação 2.17.

Para se avaliar a eficiência da coluna com a variação da temperatura utilizou-se os dados dos primeiro e segundo momentos obtidos com a injeção de pequenos pulsos cromatográficos das soluções dos enantiômeros da cetamina e do TTBB na coluna, de acordo com as Equações 2.17 e 2.18. Os segundos momentos para os enantiômeros da cetamina e para o TTBB foram obtidos pela integração das respostas dos pulsos cromatográficos experimentais, de acordo com a Equação 2.16.

Os valores de *HETP* foram obtidos a partir da Equação 2.21 e, de acordo com a Equação 2.22, a partir da inclinação da reta e interseção da curva obtida entre *HETP* e u

foram determinados os coeficientes de transferência de massa global e os coeficientes de dispersão axial, respectivamente.

3.2.2. Experimentos com soluções concentradas

Determinação das isothermas de adsorção pelo método da análise frontal

Para a determinação das isothermas de adsorção foram preparadas soluções de ambos enantiômeros da cetamina em etanol anidro a uma concentração de 5,0 g/L. Tanto as soluções dos enantiômeros quanto a fase móvel foram previamente degaseificadas.

As soluções foram introduzidas continuamente na coluna com passos de concentração de 1,0 g/L. Para tanto, foi realizada uma adsorção do tipo gradiente variando-se a vazão das duas bombas de modo que as concentrações fossem mantidas constantes durante o período de tempo determinado. Uma das bombas do aparelho de CLAE foi utilizada para alimentar um fluxo da fase móvel pura, enquanto que a segunda bomba foi utilizada para alimentar um fluxo da solução pura dos enantiômeros. A concentração do enantiômero em estudo alimentada na coluna foi determinada pela proporção entre a fase móvel pura e a solução da amostra de maneira que a vazão total (soma entre as vazões das duas bombas) fosse mantida a 1,0 mL/min, conforme descrito na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Proporção das vazões entre a fase móvel e as soluções dos enantiômeros

<i>Fase móvel (%)</i>	<i>Solução (%)</i>	<i>Concentração na coluna (g/L)</i>
100	0	0
80	20	1
60	40	2
40	60	3
20	80	4
0	100	5
100	0	0

Inicialmente, apenas a fase móvel foi alimentada na coluna. Em seguida variaram-se as vazões de ambas as bombas de forma que uma concentração de 1,0 g/L da solução dos enantiômeros atravessasse a coluna até a saturação. Ao atingir o equilíbrio, uma nova mudança nas vazões das bombas foi realizada de forma que uma nova concentração atravessasse a coluna com variação de concentração em etapas de 1,0 g/L. Este procedimento foi repetido até que apenas a solução dos enantiômeros (5,0 g/L) atravessasse a coluna. Com o novo equilíbrio atingido, substitui-se bruscamente o fluxo da bomba da solução dos enantiômeros pela bomba da fase móvel até a completa eluição.

Devido a um estouro de escala observado no detector UV do sistema cromatográfico para concentrações superiores a 2,5 g/L foi utilizado um coletor de frações. As amostras coletadas foram posteriormente analisadas em um espectrofotômetro onde previamente foi levantada curvas de calibração para ambos os enantiômeros. De posse das curvas de calibração foram construídas as curvas de ruptura múltiplas e, a partir destas curvas, com a Equação 2.33 foram obtidas as isotermas de adsorção. Diversos modelos matemáticos de isotermas de adsorção, os quais foram previamente discutidos no Capítulo 2, foram testados para verificar os melhores ajustes com os resultados experimentais.

Estudo de sobrecarga da coluna

Os perfis de eluição dos enantiômeros da cetamina foram obtidos pela injeção de volumes crescentes (20, 50 e 200 μ L) de solução concentrada (20 g/L). Os experimentos foram realizados sob condições isocráticas, a uma vazão de 1,0 mL/min e temperatura controlada de 25 °C (\pm 1°C). As respostas foram monitoradas pelo detector UV no qual foi fixado o comprimento de onda em 254 nm.

Capítulo 4

4. Resultados e Discussões

O estudo experimental e a modelagem de colunas de adsorção utilizadas em cromatografia dependem em grande extensão da determinação experimental, como precisão adequada de parâmetros fundamentais como a porosidade total do leito e das partículas porosas além daqueles relacionados com o equilíbrio e a transferência de massa. Neste capítulo, são apresentados os resultados obtidos na determinação de parâmetros importantes para o projeto de ampliação de escala, tais como a porosidade total, do leito e das partículas. Os coeficientes de dispersão axial, parâmetros de equilíbrio e de transferência de massa em fase diluída foram determinados a várias temperaturas visando a quantificação detalhada da separação de misturas racêmicas do anestésico cetamina. A obtenção das isotermas de adsorção pelo método da análise frontal e o estudo da sobrecarga da coluna foram realizados com soluções concentradas.

Experimentos com soluções diluídas

4.1. Determinação das porosidades total, do leito e das partículas

Inicialmente, determinou-se o valor de V_M correspondente ao volume morto externo a coluna, no qual está associado com os tubos conectados ao injetor da amostra até a entrada do detector na ausência da coluna. Pulsos cromatográficos de 20 μL do TTBB foram introduzidos no volume morto a diferentes vazões. O volume morto foi determinado pela

Equação 4.1 e os resultados são apresentados na Tabela 4.1. O valor médio obtido foi 0,34 mL.

$$V_M = t_M \cdot Q \quad (4.1)$$

Na equação acima, Q representa a vazão de alimentação da fase móvel e t_M o tempo de retenção dos pulsos introduzidos no sistema na ausência da coluna.

Tabela 4.1 – Volume morto determinado com injeção do TTBB nas conexões do sistema de CLAE sem a presença da coluna para cada vazão estudada

Q (mL/min)	t_M (min)	V_M (mL)
1,00	0,37	0,37
0,80	0,43	0,35
0,60	0,55	0,33
0,40	0,82	0,33
0,20	1,56	0,31

A Figura 4.1 apresenta as retas obtidas pela análise do primeiro momento para a determinação das porosidades total e do leito, de acordo com a Equação 3.1. Os valores dos primeiros momentos dos pulsos cromatográficos para a determinação das porosidades foram subtraídos dos valores de t_M . Os valores alcançados para ε_T e ε experimentalmente são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Resultado do primeiro momento para o TTBB e dextrana azul

<i>Porosidades</i>	ε_T	ε
	0,66	0,39
R^2	0,99999	0,99939

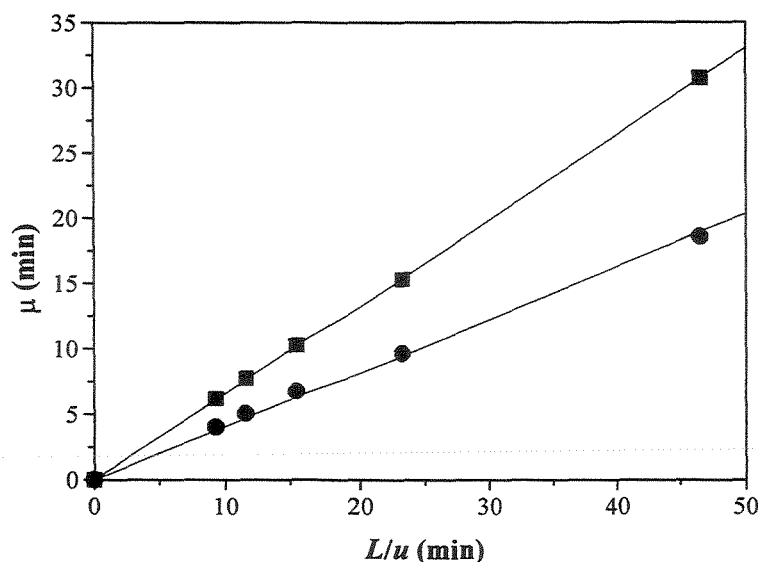


Figura 4.1 – Primeiro momento vs inverso da velocidade superficial para o TTBB (■) e para a dextrana azul (●) a 30°C.

De acordo com a correlação proposta por **Ruthven (1984)** (Eq. 3.2) o valor alcançado para ε foi de 0,38. Este resultado revela que a correlação utilizada representa bem o resultado experimental para a faixa de diâmetro de partículas do adsorvente. A porosidade da partícula foi estimada pela Equação 3.3 e o resultado encontrado foi de 0,44.

A literatura aponta valores de porosidade total para colunas empacotadas com MCTA, tendo etanol como eluente, dentro de uma faixa que varia entre 0,606 a 0,710 [**Miyabe e Guiochon, 1999; Rearden *et al.*, 1998; Seidel-Morgenstern e Guiochon, 1993a; Seidel-Morgenstern e Guiochon, 1993b; Rizzi, 1989a**]. Foi também reportado valor de porosidade total igual a 0,67 e porosidade do leito e das partículas iguais a 0,40 e 0,45, respectivamente, tendo metanol como eluente [**Pais *et al.*, 1998**]. De acordo com os resultados obtidos, os valores de porosidade determinados encontram-se dentro da faixa reportada na literatura da área abordada.

4.2. Variação dos tempos de retenção com elevação da temperatura

Os cromatogramas de eluição da cetamina racêmica para a faixa de temperatura investigada, apresentada pela Figura 4.2, revelam que para valores mais baixos de temperaturas há um grande alargamento das bandas cromatográficas. Entretanto, simplesmente pelo aumento na temperatura de 25 para 50°C houve uma melhora significativa nos perfis de eluição. Para ambos os enantiômeros a largura das bandas diminui nitidamente. **Jacobson *et al.* (1993)** constataram comportamento análogo na separação cromatográfica da base de Tröger em uma coluna empacotada com MCTA e tendo etanol como fase móvel.

Uma variação significativa nos tempos de retenção com a elevação da temperatura em 10 graus para ambos os enantiômeros da cetamina foi observado (Figura 4.3). O enantiômero mais retido, no caso a *R*-cetamina, mostrou-se mais sensível a esta elevação da temperatura provocando uma aproximação entre os picos dos dois enantiômeros à medida que a temperatura foi aumentada. Esta aproximação possui influência direta na seletividade do sistema onde os valores de α , calculados pela Equação 3.5, são apresentados na Tabela 4.3. Devido à aproximação entre os tempos de retenção dos dois enantiômeros, foi possível observar uma diminuição nos valores de α . Apesar desta variação nos valores de α com o aumento da temperatura, o sistema apresentou uma boa separação com valores de seletividade superiores a 2.

Tabela 4.3 – Fatores de capacidade (k) e seletividades (α) para cada temperatura estudada a vazão de 1,0 mL/min na separação da mistura racêmica

<i>Temperatura (°C)</i>	k_1	k_2	α
10	1,27	3,28	2,59
20	1,08	2,70	2,50
25	0,92	2,29	2,49
30	0,91	2,18	2,41
40	0,73	1,65	2,24
50	0,61	1,25	2,07

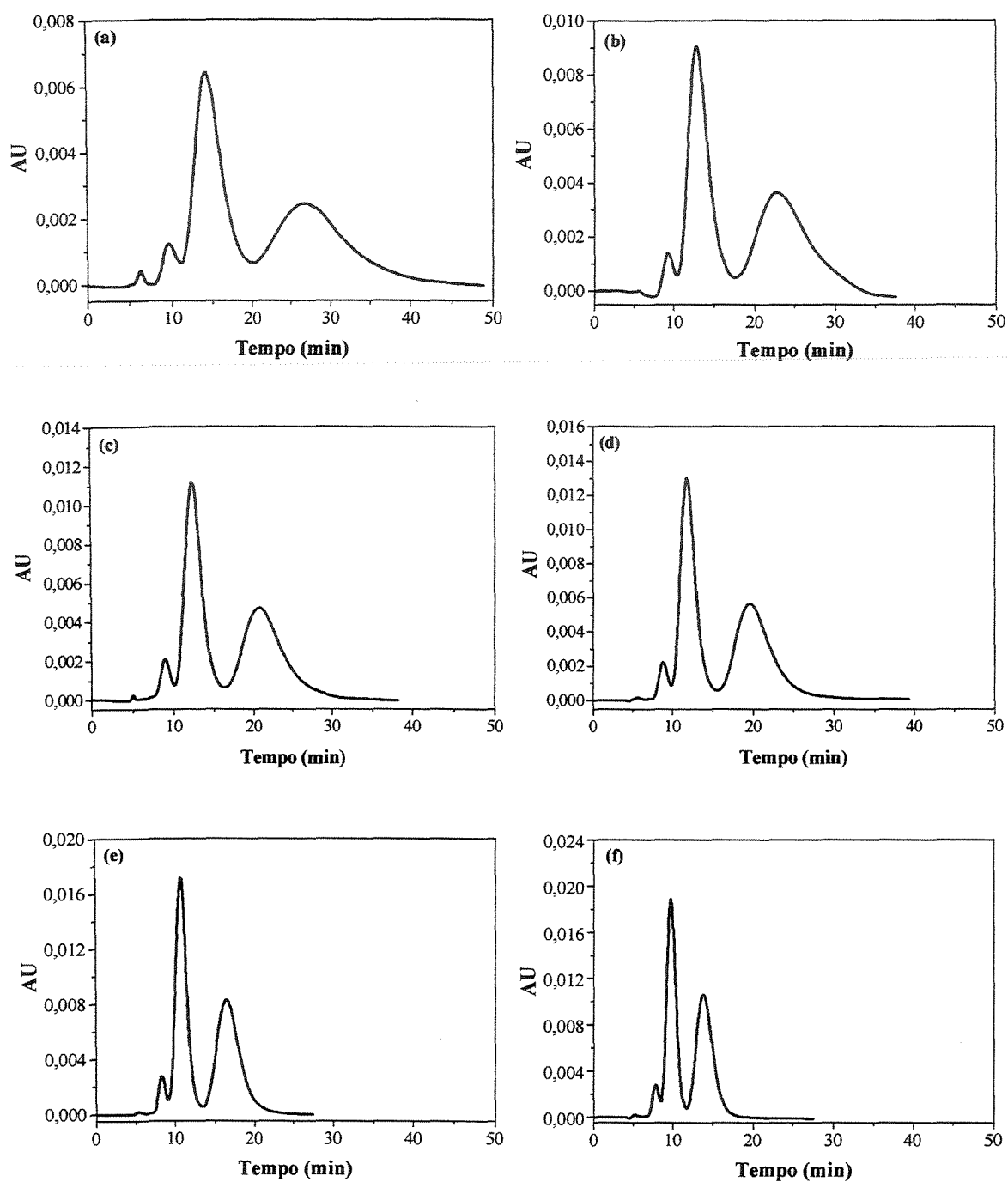


Figura 4.2 – Perfis de eluição da cetamina racêmica (1,5 g/L) a vazão de 1,0 mL/min da fase móvel e volume de injeção igual a 20 μ L: (a) 10 °C, (b) 20 °C, (c) 25 °C, (d) 30 °C, (e) 40 e (f) 50 °C.

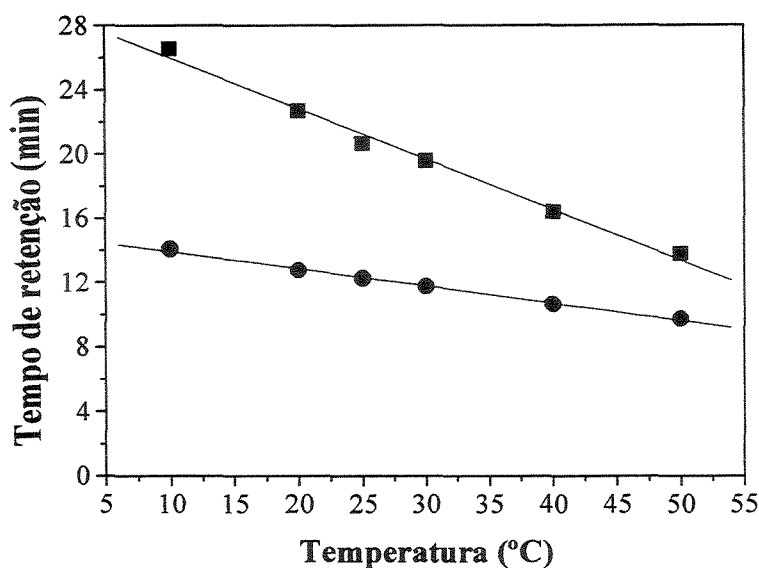


Figura 4.3 – Tempo de retenção da cetamina racêmica como função da temperatura a uma vazão de 1,0 mL/min da fase móvel. *S*-cetamina é representada pelo símbolo (●) e a *R*-cetamina pelo símbolo (■).

4.3. Determinação dos perfis de eluição para os enantiômeros da cetamina

Devido ao grande alargamento dos perfis de bandas cromatográficas observadas para as temperaturas inferiores a 25°C, optou-se por trabalhar na faixa de temperatura entre 25 e 50°C. As Figuras 4.4 e 4.5 apresentam os perfis de eluição dos enantiômeros da cetamina para a faixa de temperatura estudada a uma vazão da fase móvel igual a 1,0 mL/min. Os cromatogramas de eluição mostram que o sistema é reprodutivo, visto que os tempos de retenção foram praticamente os mesmos para os ensaios realizados em duplicata.

Os tempos de retenção para os enantiômeros da cetamina, conforme também observado nos perfis de eluição da cetamina racêmica (Fig. 4.2), diminuíram consideravelmente com a elevação da temperatura e este comportamento se mostrou bem mais acentuado para a *R*-cetamina.

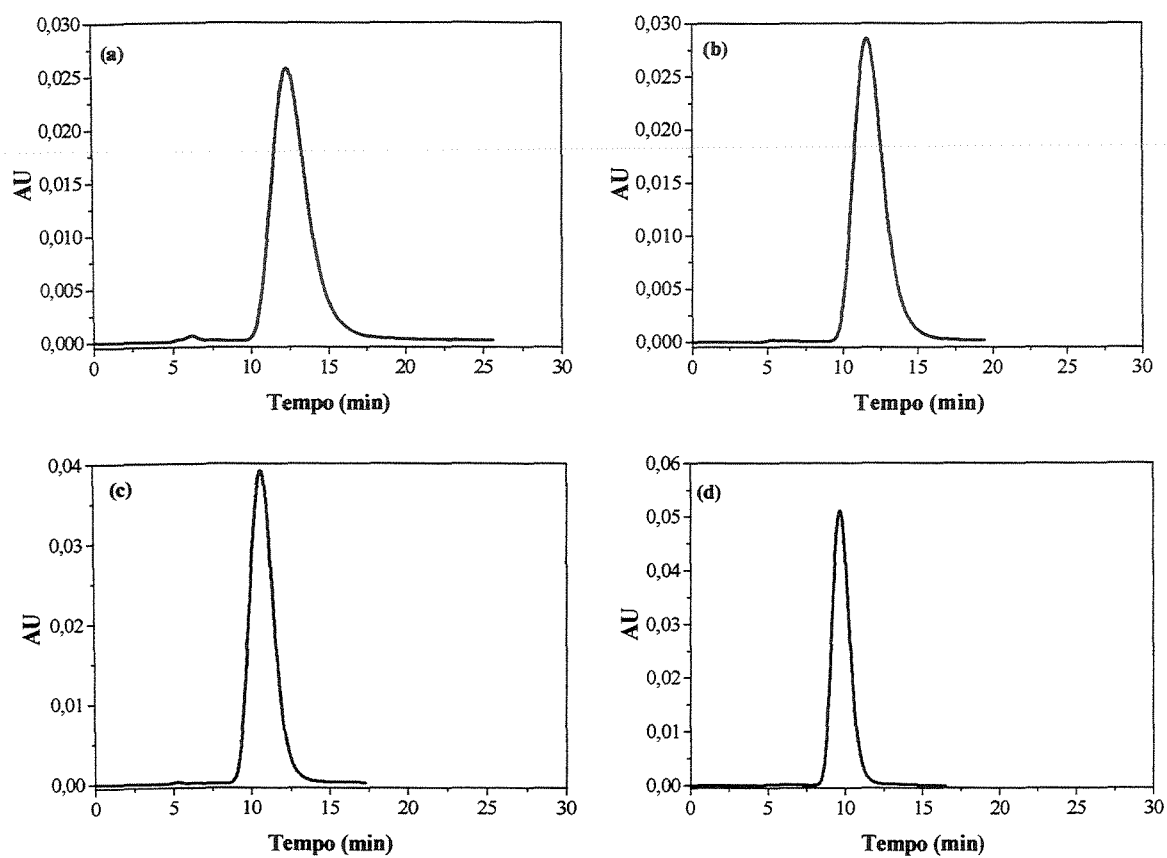


Figura 4.4 – Perfis de eluição da *S*-cetamina (2,0 g/L) a vazão de 1,0 mL/min da fase móvel e volume de injeção igual a 20 μ L: (a) 25°C, (b) 30°C, (c) 40°C e (d) 50°C.

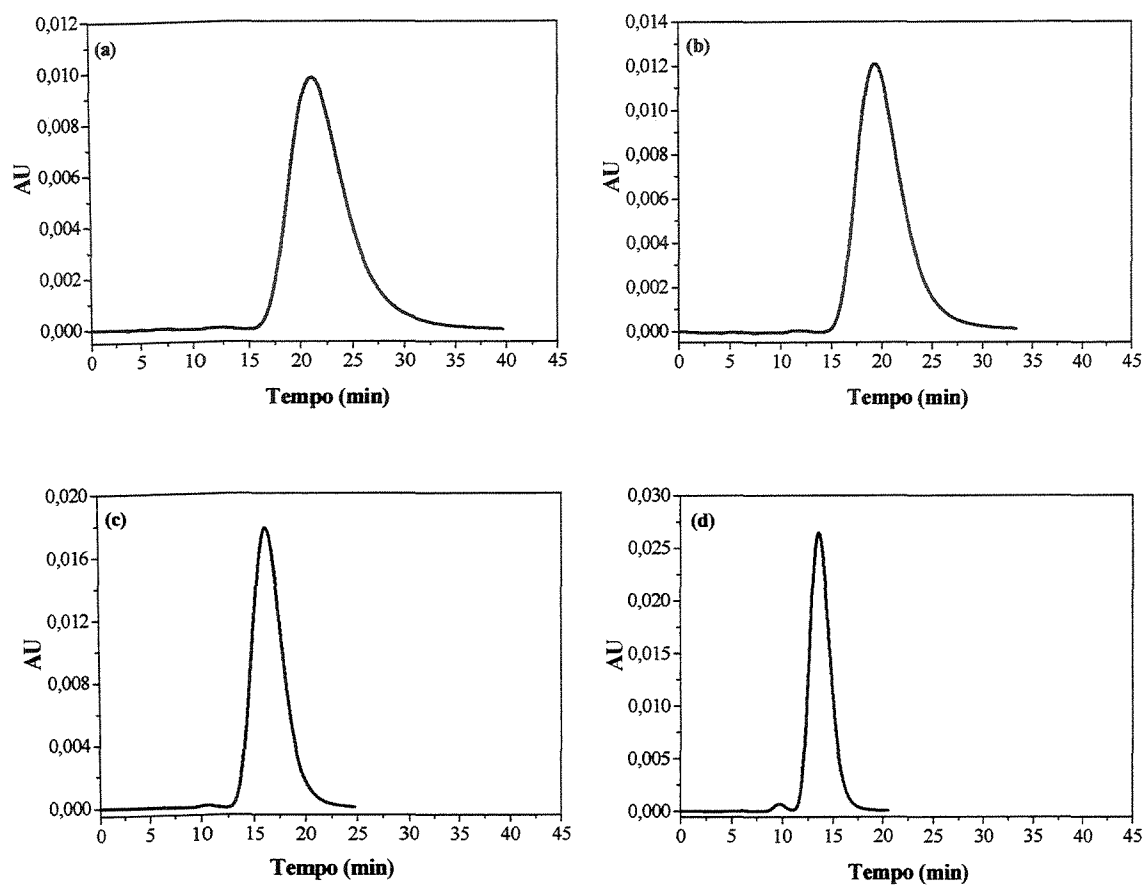


Figura 4.5 – Perfis de eluição da *R*-cetamina (2,0 g/L) a vazão de 1,0 mL/min da fase móvel e volume de injeção igual a 20 μ L: (a) 25°C, (b) 30°C, (c) 40°C e (d) 50°C.

4.4. Determinação dos parâmetros de separação cromatográfica

Os fatores de capacidade e seletividade foram determinados a partir dos tempos de retenção observados nos perfis de eluição para ambos os enantiômeros e o TTBB, descontando o valor de t_M . Os resultados de k e α são apresentados na Tabelas 4.4 para uma vazão de 1,0 mL/min, de acordo com as Equações 3.4 e 3.5, para cada temperatura estudada. Os subíndices 1 e 2 correspondem a *S*-cetamina e *R*-cetamina, respectivamente.

Tabela 4.4 – Fatores de capacidade e seletividade a vazão de 1,0 mL/min dentro da faixa de temperatura estudada para os enantiômeros da cetamina

Temperatura (°C)	t_0 (min)	t_{r1} (min)	t_{r2} (min)	k_1	k_2	α
25	6,40	12,28	21,04	0,92	2,29	2,49
30	6,08	11,59	19,35	0,90	2,18	2,41
40	6,04	10,55	16,10	0,73	1,65	2,23
50	6,02	9,66	13,56	0,60	1,25	2,07

Os resultados apresentados mostram que há uma dependência dos fatores de capacidade e de seletividade com a temperatura, conforme observado anteriormente na Tabela 4.3. A seletividade decresce com o aumento da temperatura, devido a uma maior aproximação entre os picos. Estes resultados confirmam os já determinados com a cetamina racêmica. Importante ressaltar que, como apresentado na Tabela 4.3, os valores de α calculados para a cetamina racêmica são equivalentes aos apresentados na Tabela 4.4.

4.5. Determinação das constantes de equilíbrio de adsorção linear

De acordo com as retas obtidas a diferentes temperaturas (Figura 4.6), pela análise do primeiro momento (descontando os valores de t_M), para os enantiômeros da cetamina, foi possível determinar as constantes de equilíbrio K_p pelas inclinações das retas entre μ e L/u , conforme a Equação 2.17.

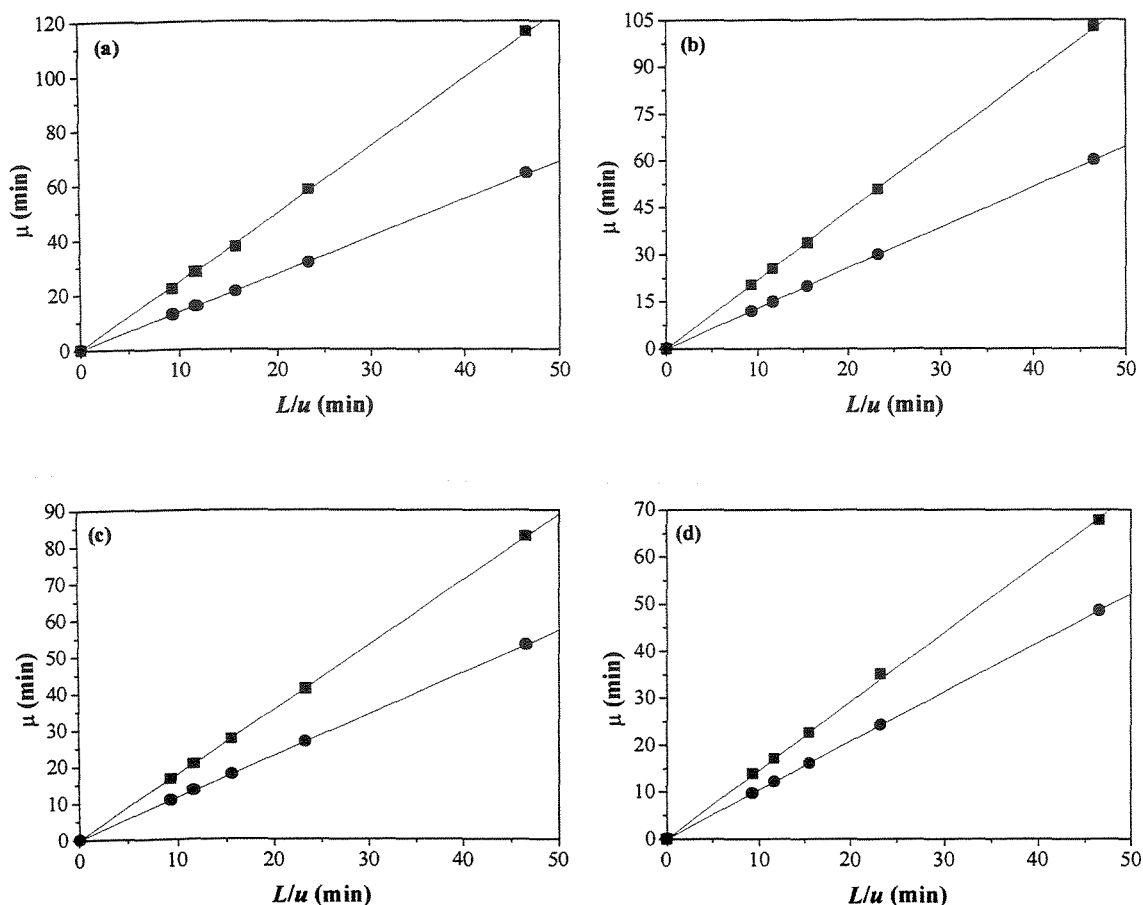


Figura 4.6 – Determinação das constantes de equilíbrio de adsorção para *S*-cetamina (●) e *R*-cetamina (■) pela análise do primeiro momento: (a) 25°C, (b) 30°C, (c) 40°C, e (d) 50°C.

Os resultados apresentados na Tabela 4.5 mostram que os valores de K_p são maiores que a unidade, decrescendo com o aumento da temperatura. Isto significa que há uma forte interação entre cada um dos enantiômeros e a coluna quiral, principalmente a temperaturas mais baixas utilizadas na realização dos experimentos. A coluna apresentou uma maior afinidade para a *R*-cetamina, com valores de K_p mais elevados que para a *S*-cetamina. Isto pode ser devido a interações estéricas diferentes entre os enantiômeros e a fase estacionária. A aumento dos valores de K_p a temperaturas mais baixas também pode significar uma importante contribuição para o alargamento das bandas devido a uma redução da cinética de desorção entre os enantiômeros e a fase estacionária.

Tabela 4.5 – Valores de K_p para os enantiômeros da cetamina

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>S-cetamina</i>		<i>R-cetamina</i>	
	K_p	R^2	K_p	R^2
25	2,09	0,99993	5,35	0,99995
30	1,85	0,99999	4,51	0,99998
40	1,42	0,99999	3,28	0,99999
50	1,13	0,99999	2,37	0,99975

4.6. Determinação dos coeficientes de dispersão axial e dos parâmetros de transferência de massa

Para se avaliar a eficiência da coluna com a mudança na temperatura utilizou-se os dados dos primeiro e segundo momentos de ambos os enantiômeros, conforme a Equação 2.22, e os resultados são apresentados nas Figuras 4.7, 4.8 e 4.9.

Observando-se as Figuras 4.7, 4.8 e 4.9 foi possível verificar a não existência de um mínimo no gráfico de Van Deemter ocorrendo uma dependência linear entre $HETP$ e u , indicando que a eficiência da coluna é controlada pelos efeitos de dispersão axial e de resistência à transferência de massa. Nota-se também uma forte dependência da eficiência com a temperatura e vazão da fase móvel. Para todos os valores de temperatura investigados, o isômero mais retido apresentou a menor eficiência, seguido pelo isômero menos retido, e finalmente pelo TTBB, que apresentou a maior eficiência dentre os três. A combinação entre uma maior eficiência da coluna e uma diminuição nos tempos de retenção com a elevação da temperatura são responsáveis pela diminuição nas larguras dos perfis das bandas cromatográficas, como observado nas Figuras 4.2, 4.4 e 4.5.

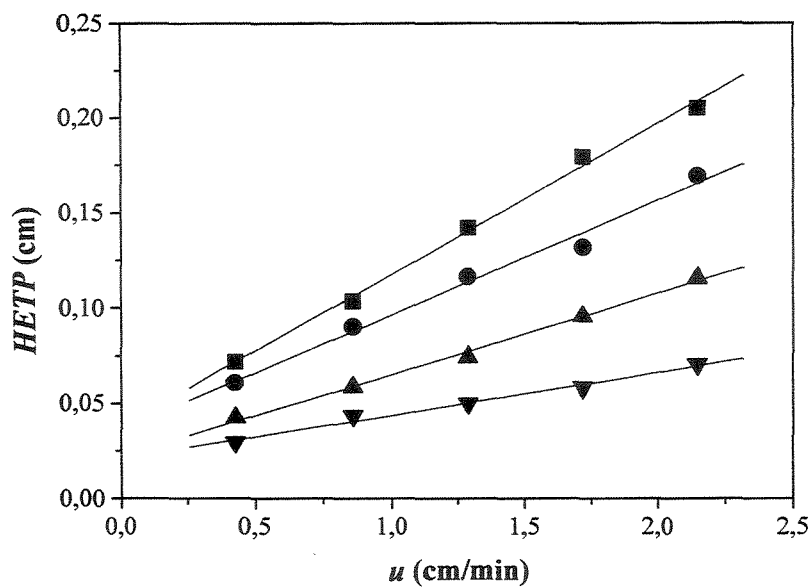


Figura 4.7 – Gráfico de Van Deemter para a *S*-cetamina a: (■) 25°C, (●) 30°C, (▲) 40°C e (▼) 50°C.

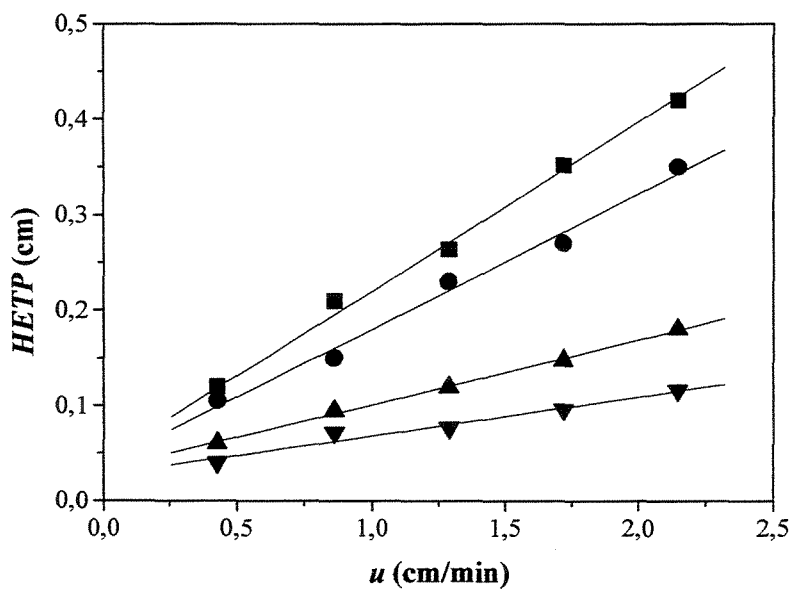


Figura 4.8 – Gráfico de Van Deemter para a *R*-cetamina a: (■) 25°C, (●) 30°C, (▲) 40°C e (▼) 50°C.

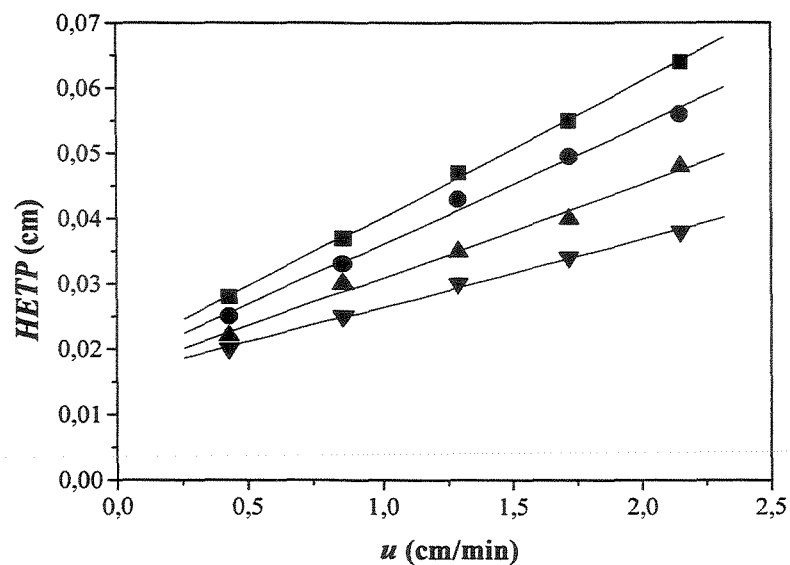


Figura 4.9 – Gráfico de Van Deemter para o TTBB a: (■) 25°C, (●) 30°C, (▲) 40°C e (▼) 50 °C.

As Tabelas 4.6, 4.7 e 4.8 apresentam os valores dos parâmetros A e C da equação de Van Deemter para ambos os enantiômeros da cetamina e para o TTBB. Os termos A e C foram determinados a partir da interseção e inclinação das retas obtidas entre $HETP$ e u , respectivamente.

Tabela 4.6 – Parâmetros A e C da equação de Van Deemter para a S -cetamina

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>A (cm)</i>	<i>C (min)</i>	<i>R²</i>
25	0,0377	0,0797	0,99794
30	0,0359	0,0603	0,99358
40	0,0222	0,0427	0,99773
50	0,0212	0,0225	0,99239

Tabela 4.7 – Parâmetros A e C da equação de Van Deemter para a R -cetamina

<i>Temperatura</i> (°C)	<i>A</i> (cm)	<i>C</i> (min)	R^2
25	0,0425	0,1773	0,99318
30	0,0380	0,1420	0,99793
40	0,0328	0,0682	0,99876
50	0,0269	0,0412	0,98018

Tabela 4.8 – Parâmetros A e C da equação de Van Deemter para o TTBB

<i>Temperatura</i> (°C)	<i>A</i> (cm)	<i>C</i> (min)	R^2
25	0,0192	0,0209	0,99951
30	0,0178	0,0183	0,99631
40	0,0164	0,0144	0,99535
50	0,0159	0,0105	0,99827

Os valores de A deveriam permanecer constantes. Entretanto, constatou-se que os valores variaram ligeiramente com a temperatura. **Jacobson *et al.* (1993)** atribui este comportamento a distribuição do tamanho de partículas do material empacotado, e também a suas irregularidades.

Dentro da faixa de vazão da fase móvel utilizada os gráficos de $HETP$ vs u possuem um comportamento linear e, a partir da extrapolação das retas obtidas, foi possível determinar os valores de A da equação de Van Deemter. O fato de ter sido desconsiderado o termo B da equação de Van Deemter, o qual está relacionado com os efeitos da difusão molecular, pode justificar esta pequena diferença observada nos valores de A com o aumento da temperatura. A influência da difusão molecular para a dispersão axial costuma ser pequena e normalmente só é percebida a baixas velocidades de escoamento do fluido. De fato, até o menor valor de vazão empregado (0,2 mL/min), essa influência não foi sentida. No entanto, como o valor de A corresponde ao ponto de interseção da curva $HETP$ vs u com o eixo y , seu valor pode vir a ser influenciado pelo termo correspondente à difusão molecular, considerável a valores mínimos de vazão, os quais não foram testados.

A partir da Tabela 4.6 a 4.8 foram calculados os valores dos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa global, mostrados na Tabela 4.9 e 4.10. Como a mistura axial no sistema em estudo foi considerada ser determinada pelo escoamento entre os espaços vazios do leito desprezando os efeitos de difusão molecular, esta contribuição para *HETP* dever ser aproximadamente o mesmo para todos os adsorbatos. Isto implica que todos o solutos deveriam ter o mesmo *HETP*, a zero de velocidade superficial da fase móvel. De fato, para uma dada temperatura, os dois enantiômeros apresentam aproximadamente o mesmo valor de D_L/u , mas o valor correspondente ao TTBB cai ligeiramente.

Tabela 4.9 – Valores de D_L/u e k_m obtidos a partir da análise dos momentos para os enantiômeros da cetamina

<i>Temperatura</i> (°C)	D_L/u (cm)		k_m (min ⁻¹)	
	<i>S</i> -cetamina	<i>R</i> -cetamina	<i>S</i> -cetamina	<i>R</i> -cetamina
25	0,0188	0,0213	5,12	1,51
30	0,0180	0,0190	7,02	2,07
40	0,0111	0,0164	10,55	5,05
50	0,0106	0,0135	20,89	9,52

Tabela 4.10 – Valores de D_L/u obtidos a partir da análise dos momentos para o TTBB

<i>Temperatura</i> (°C)	D_L/u (cm)
25	0,0096
30	0,0089
40	0,0082
50	0,0080

Os resultados apresentados na Tabela 4.9 mostram que os valores de k_m , para ambos os enantiômeros, aumentaram com a elevação da temperatura. De acordo com a magnitude dos valores de k_m , observa-se uma baixa transferência de massa na coluna quiral. Conforme

afirmado por **Miyabe e Guiochon (1999)** e **Jacobson *et al.* (1993)**, a principal contribuição para o alargamento das bandas em uma coluna de MCTA é a baixa cinética de transferência de massa. De fato, os perfis de eluição da cetamina racêmica, para as temperaturas mais baixas investigadas no presente trabalho, nota-se um considerável alargamento das bandas, principalmente para o enantiômero mais retido, onde os valores mais baixos de k_m foram encontrados.

Os valores de difusividade molecular (D_m) foram estimados pela equação de Wilke-Chang, representada pela Equação 4.2, conforme descrito por **Cremasco *et al.* (2001)**, **Miyabe e Guiochon (2000)**, **Miyabe e Guiochon (1999)** e **Miyabe e Suzuki (1992)**,

$$D_m = 7,4 \cdot 10^{-8} \frac{(\phi M)^{1/2} T}{\eta V_b^{0,6}} \quad (4.2)$$

onde ϕ corresponde ao coeficiente de associação do solvente cujo valor é de 1,5 para o etanol, M é a massa molecular do solvente, η é a viscosidade da solução, T é a temperatura absoluta, e V_b é o volume molar à temperatura de ebulição. O valor de V_b para os enantiômeros da cetamina foi determinado pelos volumes de Le Bas, de acordo com **Welty *et al.* (1984)** e **Cremasco (1998)**, e o valor estimado foi de 288,3 g/cm³. Os resultados obtidos pelas Equações 4.2 são apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Coeficientes de difusão molecular

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>D_m (cm²/min)</i>
25	9,19·10 ⁻⁰⁶
30	9,88·10 ⁻⁰⁶
40	1,26·10 ⁻⁰⁵
50	1,54·10 ⁻⁰⁵

Os coeficientes de transferência de massa no filme (k_f) foram estimados pela Equação de Wilson-Geankoplis, representado pela Equação 4.3, no qual é válida para sistemas líquidos dentro da faixa 0,0015 < Re_p < 55, conforme **Cremasco *et al.* (2001)**,

$$Sh_p \equiv \frac{d_p k_f}{D_m} = \frac{1,09}{\varepsilon} Pe_{Mp}^{1/3} \quad (4.3a)$$

$$Pe_{Mp} = \frac{d_p \varepsilon u}{D_m} \quad (4.3b)$$

$$Re_p = \frac{d_p \varepsilon u}{\nu} \quad (4.3c)$$

onde Sh_p , Re_p e Pe_{Mp} são os números de Sherwood, de Reynolds e de Peclet mássicos da partícula, e ν é a viscosidade cinemática da solução.

Nas Tabela 4.12 – 4.15 são apresentados os valores de k_f , determinados pela Equação 4.3, para a faixa de vazão da fase móvel e temperatura investigada no presente trabalho. Os resultados apresentados mostram que, para as temperaturas de 25 e 30°C, apenas para as vazões de 0,8 e 1,0 mL/min, os valores de Re_p encontram-se dentro da faixa onde k_f é válido. Para as temperaturas de 40 e 50°C, a faixa de vazão onde k_f é válido foi de 0,6 a 1,0 mL/min.

Tabela 4.12 – Variação dos valores de k_f com a velocidade superficial da fase móvel a temperatura de 25°C

Q (mL/min)	Re_p	Pe_{MP}	k_f (cm/min)
1,0	0,00199	182	$7,25 \cdot 10^{-02}$
0,8	0,00159	146	$7,73 \cdot 10^{-02}$
0,6	0,00119	109	$6,11 \cdot 10^{-02}$
0,4	0,00079	73	$5,34 \cdot 10^{-02}$
0,2	0,00040	36	$4,24 \cdot 10^{-02}$

Tabela 4.13 – Variação dos valores de k_f com a velocidade superficial da fase móvel a temperatura de 30°C

Q (mL/min)	Re_P	Pe_{MP}	k_f (cm/min)
1,0	0,00210	170	$7,62 \cdot 10^{-02}$
0,8	0,00168	136	$7,07 \cdot 10^{-02}$
0,6	0,00126	102	$6,43 \cdot 10^{-02}$
0,4	0,00084	68	$5,62 \cdot 10^{-02}$
0,2	0,00042	34	$4,46 \cdot 10^{-02}$

Tabela 4.14 – Variação dos valores de k_f com a velocidade superficial da fase móvel a temperatura de 40°C

Q (mL/min)	Re_P	Pe_{MP}	k_f (cm/min)
1,0	0,00259	133	$8,97 \cdot 10^{-02}$
0,8	0,00207	106	$8,32 \cdot 10^{-02}$
0,6	0,00156	80	$7,56 \cdot 10^{-02}$
0,4	0,00104	53	$6,61 \cdot 10^{-02}$
0,2	0,00052	27	$5,25 \cdot 10^{-02}$

Tabela 4.15 – Variação dos valores de k_f com a velocidade superficial da fase móvel a temperatura de 50°C

Q (mL/min)	Re_P	Pe_{MP}	k_f (cm/min)
1,0	0,00306	110	$1,02 \cdot 10^{-01}$
0,8	0,00245	88	$9,52 \cdot 10^{-02}$
0,6	0,00184	66	$8,65 \cdot 10^{-02}$
0,4	0,00122	44	$7,55 \cdot 10^{-02}$
0,2	0,00061	22	$5,99 \cdot 10^{-02}$

O coeficiente de transferência de massa externo a partícula (k_f) é dependente da vazão da fase móvel. Os valores de Re_p encontrados fora da faixa indicada podem ser atribuídos a uma combinação entre as baixas vazões utilizadas e a uma dada temperatura investigada.

De posse dos valores de k_f foi possível avaliar a resistência à transferência de massa devido ao transporte externo ($d_p/6k_f$), como indicado pela Tabela 4.16.

Tabela 4.16 – Resistência à transferência de massa devido ao transporte externo

u (cm/min)	<i>Temperatura (°C)</i>			
	25	30	40	50
2,15	$4,60 \cdot 10^{-03}$	$4,37 \cdot 10^{-03}$	$3,72 \cdot 10^{-03}$	$3,25 \cdot 10^{-03}$
1,72	$4,95 \cdot 10^{-03}$	$4,71 \cdot 10^{-03}$	$4,00 \cdot 10^{-03}$	$3,50 \cdot 10^{-03}$
1,29	$5,45 \cdot 10^{-03}$	$5,18 \cdot 10^{-03}$	$4,41 \cdot 10^{-03}$	$3,85 \cdot 10^{-03}$
0,86	$6,24 \cdot 10^{-03}$	$5,93 \cdot 10^{-03}$	$5,04 \cdot 10^{-03}$	$4,41 \cdot 10^{-03}$
0,43	$7,86 \cdot 10^{-03}$	$7,47 \cdot 10^{-03}$	$6,35 \cdot 10^{-03}$	$5,56 \cdot 10^{-03}$

Com os resultados apresentados na Tabela 4.16 e 4.9 foi possível determinar a contribuição resistência à transferência de massa devido à difusão no poro ($d_p^2/60\varepsilon_p D_p$) e, por consequência, os valores de D_p , como apresentado nas Tabelas 4.17 e 4.18. Para realização dos cálculos foram utilizados os resultados obtidos com a vazão da fase móvel igual a 1,0 mL/min (velocidade superficial igual a 2,15 cm/min).

Tabela 4.17 – Resistência à transferência de massa devido à difusão no poro

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>S-cetamina</i>	<i>R-cetamina</i>
25	$1,90 \cdot 10^{-01}$	$6,60 \cdot 10^{-01}$
30	$1,38 \cdot 10^{-01}$	$4,79 \cdot 10^{-01}$
40	$9,11 \cdot 10^{-02}$	$1,94 \cdot 10^{-01}$
50	$4,46 \cdot 10^{-02}$	$1,02 \cdot 10^{-01}$

Tabela 4.18 – Valores de difusividade no poro

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>D_p (cm²/min)</i>	
	<i>S-cetamina</i>	<i>R-cetamina</i>
25	$7,95 \cdot 10^{-07}$	$2,29 \cdot 10^{-07}$
30	$1,10 \cdot 10^{-06}$	$3,16 \cdot 10^{-07}$
40	$1,66 \cdot 10^{-06}$	$7,80 \cdot 10^{-07}$
50	$3,39 \cdot 10^{-06}$	$1,48 \cdot 10^{-06}$

Os resultados mostram que a cinética de transferência de massa é controlada pela difusão nos poros das partículas. Comparando o valor de D_m calculados para os enantiômeros da cetamina a 40°C, estimados pela Equação 4.2, isto é, $1,26 \cdot 10^{-05}$ cm²/min, os valores de D_p são menores que D_m por um fator aproximado de 8 para a *S*-cetamina e 16 para a *R*-cetamina. Conforme relatado por **Miyabe e Guiochon (1999)**, o estudo cinético da transferência de massa do enantiômero (*S*) da base de Tröger em MCTA e etanol como fase móvel apresentou valor de D_p menor que o valor de D_m na ordem de 160, para uma temperatura de 40 °C. **Guiochon et al. (1994)** afirma que resultados experimentais apresentam valores de D_p menores que D_m entre 3 e 30 vezes, para empacotamentos cromatográficos típicos onde a porosidade da partícula encontra-se numa faixa entre 0,30 e 0,70. As taxas D_p/D_m estimadas neste estudo estão de acordo com a afirmação prevista, conforme a Tabela 4.19. Provavelmente, a baixa eficiência da coluna para os enantiômeros da cetamina (o qual apresentou a uma temperatura de 25°C $N_p=715$ para o TTBB, $N_p=279$ para *S*-cetamina, $N_p=167$ para *R*-cetamina) possa ser explicado pelos baixos valores de D_p .

Tabela 4.19 – Variação na taxa D_p/D_m com a temperatura para os enantiômeros da cetamina

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>S-cetamina</i>	<i>R-cetamina</i>
25	12	40
30	9	31
40	8	16
50	5	10

4.7. Análise termodinâmica de adsorção

A Equação 4.4, derivada da equação de Gibbs-Helmholtz, permite a determinação da entalpia molar de adsorção, ΔH_{ads} , através da relação entre a constante de equilíbrio de adsorção linear, K_p , e a temperatura absoluta, T :

$$\frac{\partial(\ln K_p)}{\partial(1/T)} = -\frac{\Delta H_{ads}}{R} \quad (4.4)$$

onde R representa a constante universal dos gases [Miyabe e Guiochon, 1999; Seidel-Morgenstern e Guiochon, 1993b].

De acordo com a Equação 4.4, a partir da inclinação das retas obtidas entre $\ln K_p$ e $1/T$ (Figura 4.10), foi possível obter a energia molar de adsorção para ambos os enantiômeros.

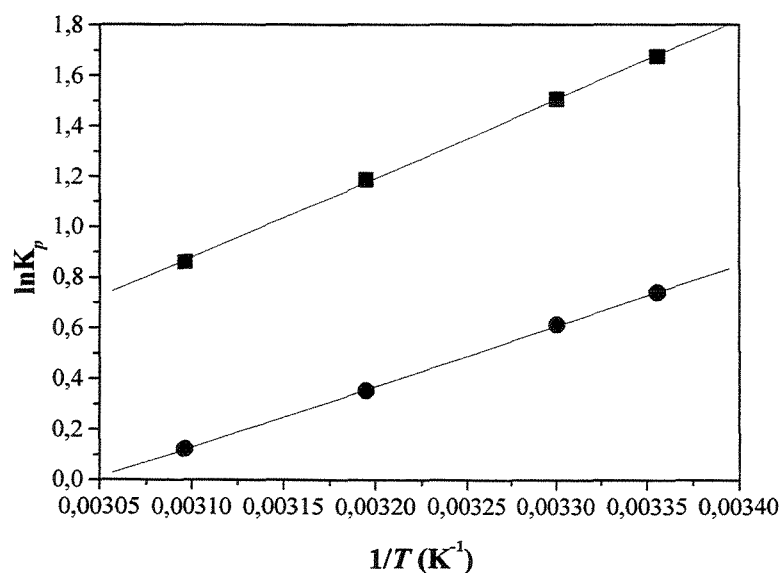


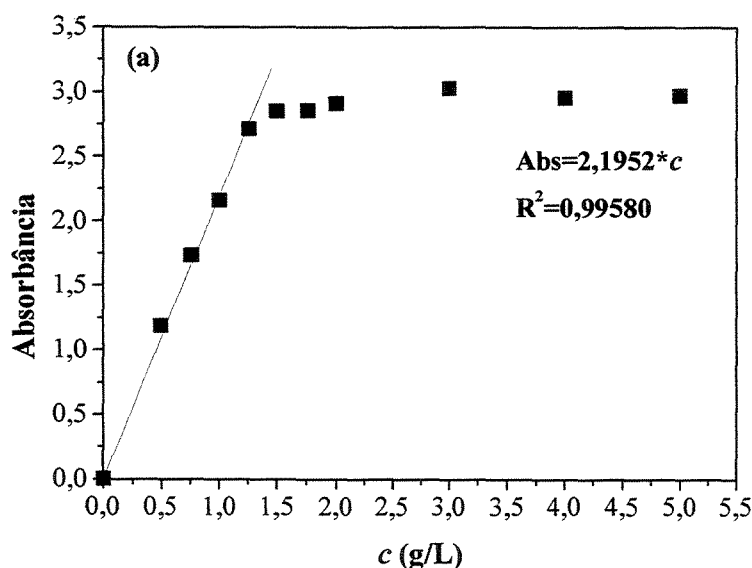
Figura 4.10 – Dependência da constante de equilíbrio de adsorção linear (K_p) com a temperatura para os enantiômeros da cetamina. *S*-cetamina é representada pelo símbolo (●) e a *R*-cetamina pelo símbolo (■).

Observou-se uma dependência linear entre $\ln K_p$ e $1/T$ onde a *S*-cetamina apresentou um valor de ΔH_{ads} igual a $-19,915$ kJ/mol enquanto que a *R*-cetamina um valor de ΔH_{ads} igual a $-26,020$ kJ/mol. Apenas para efeito de comparação é interessante observar os resultados apresentados por Jacobson *et al.* (1993), com relação a separação cromatográfica do enantiômeros da base de Tröger em MCTA e etanol a várias temperaturas. Estes autores encontraram valores de ΔH_{ads} igual a $-20,1$ kJ/mol para o enantiômero menos retido e $-22,3$ kJ/mol para o enantiômero mais retido.

Experimentos com soluções concentradas

4.8. Determinação das isotermas de adsorção

A Figuras 4.11 apresenta as curvas de calibração absorbância vs concentração obtidas para os enantiômeros da cetamina. A partir destas curvas de calibração foi possível calcular as concentrações das amostras coletadas durante os experimentos para obtenção das isotermas de adsorção.



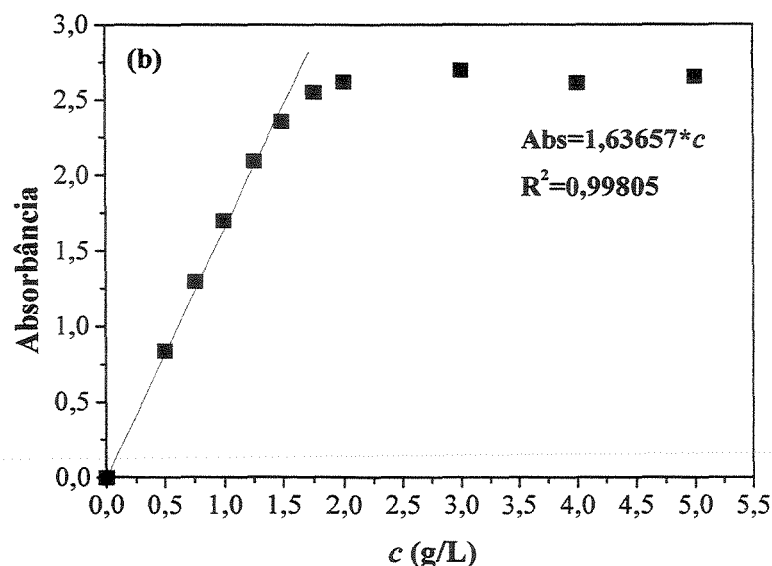


Figura 4.11 – Curva de calibração absorbância vs concentração para os enantiômeros da cetamina: (a) S -cetamina; (b) R -cetamina.

Para concentrações da S -cetamina superiores a 1,26 g/L e da R -cetamina superiores a 1,50 g/L, de acordo com as curvas de calibração, foi necessário diluir as amostras para que estas se encontrassem dentro da região linear e, finalmente, para que pudessem ser efetuadas as leituras no espectrofotômetro.

A Figura 4.12 apresenta os cromatogramas da análise frontal obtidos a temperatura de 25°C para ambos os enantiômeros da cetamina. As curvas de rupturas múltiplas foram obtidas a uma vazão total de 1,0 mL/min com passos de concentração de 1,0 g/L de $c_0 = 1,0$ g/L a $c_0 = 5,0$ g/L. As curvas de ruptura para os isômeros da cetamina apresentam uma diferença significativa com relação ao tempo para que estes enantiômeros atinjam o equilíbrio, ou seja, até atingir o platô. De fato, o enantiômeros mais retido (R -cetamina) leva mais tempo para atingir o platô devido a sua maior retenção provocada pela maior afinidade pela coluna quiral.

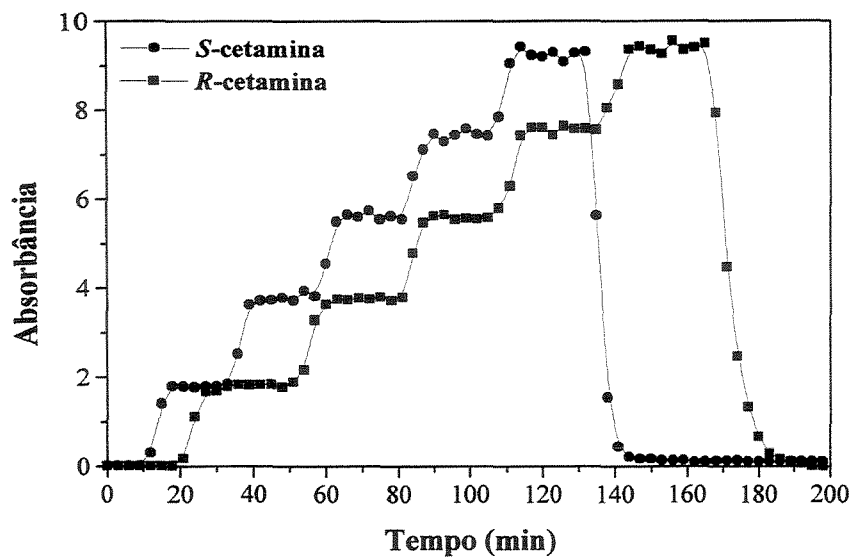


Figura 4.12 – Análise frontal para determinação das isotermas de adsorção dos enantiômeros da cetamina a 25°C. As leituras no espectrofotômetro foram realizadas com comprimento de onda igual a 254 nm.

As isotermas de equilíbrio obtidas pela adsorção dos enantiômeros da cetamina em MCTA a 25°C são apresentadas na Figura 4.13. A quantidade de soluto adsorvida na fase estacionária (q) em equilíbrio com a quantidade de soluto na fase móvel (c), para cada enantiômero da cetamina, foi obtida através da Equação 2.33.

Os pontos experimentais foram ajustados pelo software ORIGIN 6.0, pelos modelos de isotermas de adsorção de Langmuir (L), Langmuir-Freundlich (LF) e Tóth (T), os quais foram previamente discutidos no Capítulo 2. Os modelos citados descrevem bem as isotermas experimentais apresentando bons coeficientes de correlação R^2 , conforme Tabela 4.20. Apesar do modelo de Tóth ter apresentado um bom coeficiente de correlação para ambos os enantiômeros, nota-se que, para a *R*-cetamina o parâmetro a da isoterma apresenta um erro de $\pm 5,3693$.

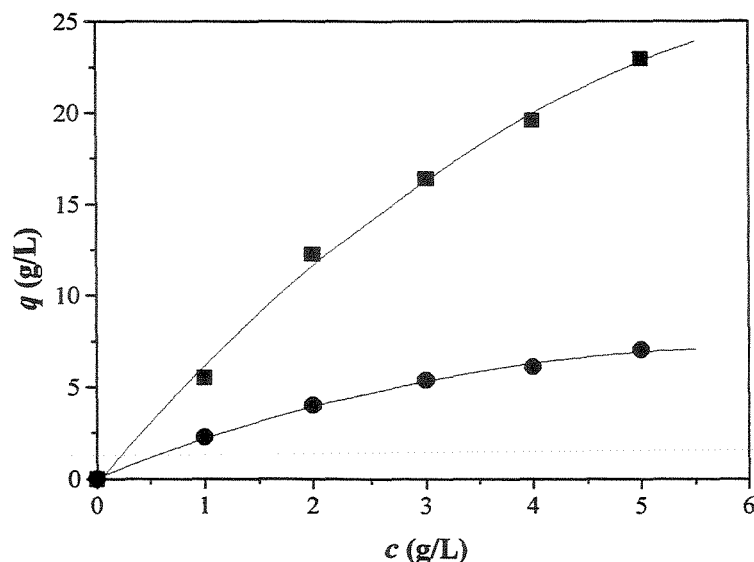


Figura 4.13 – Isotermas de adsorção dos enantiômeros da cetamina em MCTA a 25 °C obtidos pelo método da análise frontal *S*-cetamina é representada pelo símbolo (●) e a *R*-cetamina pelo símbolo (■).

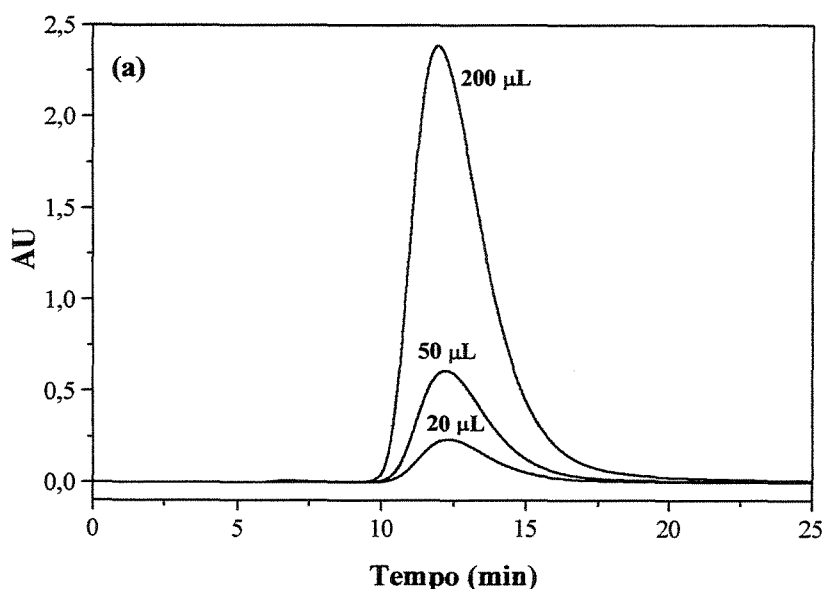
Tabela 4.20 – Parâmetros das isotermas de adsorção obtidos pela análise frontal

<i>Modelo</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>S</i> -cetamina	<i>R</i> -cetamina
L	<i>a</i>	2,81605 ±0,11727	7,10175 ±0,68023
	<i>b</i> (L/g)	0,20134 ±0,0195	0,10947 ±0,03486
	R²	0,99888	0,99664
LF	<i>a</i>	2,82632 ±0,12759	6,8747 ±0,46434
	<i>b</i> (L/g)	0,23455 ±0,04572	0,18848 ±0,03025
	<i>v</i>	1,10074 ±0,13907	1,34663 ±0,17254
	R²	0,99904	0,99855
T	<i>a</i>	3,03323 ±0,4528	11,08519 ±5,3693
	<i>b</i> (L/g)	0,17797 ±0,03491	0,11532 ±0,02036
	<i>v</i>	1,15824 ±0,3057	1,76385 ±1,03254
	R²	0,99898	0,99754

Estudos realizados por Seidel-Morgenstern e Guiochon (1993a), Seidel-Morgenstern e Guiochon (1993b) e Seidel-Morgenstern *et al.* (1993), tendo MCTA como fase estacionária e etanol como fase móvel para separação cromatográfica dos enantiômeros da base de Tröger, apresentam como resultados isotermas de adsorção ajustadas pelo modelo de Langmuir para o enantiômero menos retido enquanto que para o enantiômero mais retido o melhor ajuste foi obtido pelo modelo quadrático.

4.9. Estudo da sobrecarga da coluna

A Figuras 4.14 apresenta os cromatogramas para três injeções consecutivas, com volumes de injeção diferentes (20, 50 e 200 μL) a 20 g/L, dos enantiômeros da cetamina com vazão da fase móvel a 1,0 mL/min e temperatura a 25 °C. Foi possível observar que para volumes menores de injeção houve uma maior alargamento dos picos. Com o aumento do volume de injeção houve uma melhor definição dos perfis de eluição gerando para ambos enantiômeros uma ligeira diminuição nos tempos de retenção sendo que para o enantiômero mais retido (*R*-cetamina) esta diminuição foi mais acentuada.



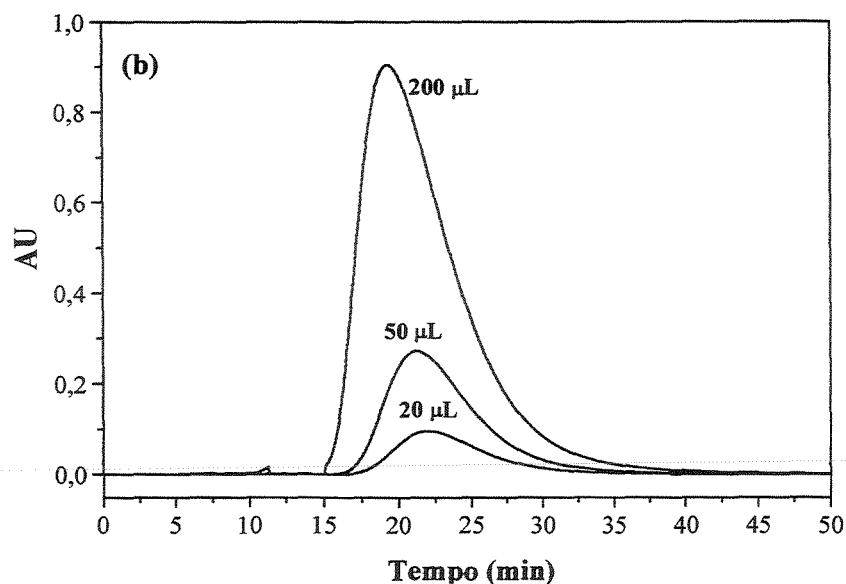


Figura 4.14 – Perfis de eluição para injeções de soluções concentradas (20 g/L) dos enantiômeros da cetamina a 25°C e 1,0 mL/min: (a) *S*-cetamina; (b) *R*-cetamina. Volumes de injeção: 20, 50 e 200 µL.

Seidel-Morgenstern *et al.* (1993a) e Seidel-Morgenstern e Guiochon (1993) constataram que, para a base de Tröger (em MCTA como fase estacionária e etanol como fase móvel) o enantiômero menos retido possui um comportamento análogo ao observado para os enantiômeros da cetamina. Entretanto, para o enantiômero mais retido um comportamento incomum foi observado. Inicialmente houve um aumento nos tempos de retenção, porém com volumes de injeções maiores houve uma diminuição significativa no tempo de retenção. Este comportamento incomum descrito pelos autores foi justificado pelo tipo de isoterma de adsorção (isoterma quadrática). Este comportamento também foi reportado por Okamoto *et al.* (1984b). Mihlbachler *et al.* (2002) relata o mesmo comportamento para o enantiômero mais retido da base de Tröger tendo como fase estacionária a Chiralpak AD e 2-propanol como fase móvel. Porém, para o enantiômero menos retido houve um aumento nos tempos de retenção.

Capítulo 5

5. Conclusões

Neste trabalho é aplicado um procedimento para a determinação experimental de parâmetros essenciais que descrevem e quantificam a forma como ocorre a separação dos enantiômeros de uma mistura racêmica através da utilização de uma *fase estacionária quiral*, em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os parâmetros determinados são de importância fundamental para se projetar experimentos no sistema de cromatografia contínua (leito móvel simulado), o qual faz parte da linha de pesquisa do laboratório de biosseparações, do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP.

Os estudos aqui apresentados mostraram que o MCTA pode ser utilizado na separação cromatográfica dos enantiômeros da cetamina. Para a faixa de temperatura e vazão abordada na execução dos experimentos o sistema apresentou valores de seletividade relativamente altos, com valores acima de 2,0.

O método dos momentos foi empregado na determinação de parâmetros como a porosidade total do leito de MCTA, das constantes de equilíbrio, dispersão axial e os coeficientes de transferência de massa global. A fase estacionária exibe uma maior afinidade para a *R*-cetamina. Os valores das constantes de equilíbrio decresceram com o aumento da temperatura sendo que para o *S*-cetamina este decréscimo foi 39% e para o *R*-cetamina 47%. Os valores de dispersão axial praticamente permaneceram constantes para os dois enantiômeros da cetamina para cada temperatura estudada, caindo ligeiramente com relação ao TTBB. Os valores dos coeficientes de transferência de massa global aumentaram com a elevação da temperatura de 5,12 min⁻¹ para 20,89 min⁻¹ com relação à *S*-cetamina e de 1,51 min⁻¹ para 9,52 min⁻¹ com relação à *R*-cetamina. Estes resultados mostram que há

uma relativa baixa cinética de transferência de massa na coluna quiral, com valores mais elevados para uma temperatura de 50°C.

Pode-se ainda concluir que o grande alargamento das bandas cromatográficas observadas para os valores de temperatura mais baixos investigados neste trabalho é devido às interações mais fortes entre a fase estacionária e os enantiômeros da cetamina como também à cinética de transferência de massa. De fato, com a elevação da temperatura foi possível observar uma melhora significativa nos perfis de bandas cromatográficas. Os resultados mostram claramente que a elevação da temperatura provoca uma diminuição nos valores das constantes de equilíbrio e um aumento nos valores dos coeficientes de transferência de massa global contribuindo para uma diminuição na largura dos picos.

A resistência à transferência de massa devido à difusão no poro é controladora dos processos de transferência de massa na coluna quiral. A baixa eficiência da coluna provavelmente deva-se aos baixos valores de D_p .

A análise frontal adaptada para um protocolo que utiliza degraus sucessivos (curvas de rupturas múltiplas), para a determinação das isotermas de adsorção mostrou ser um método bastante rápido e eficaz. Uma das grandes vantagens deste método é o relativo baixo consumo de material. Os dados de equilíbrio determinados neste estudo podem ser descritos satisfatoriamente pelos modelos de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Tóth.

Experimentos de sobrecarga foram realizados com os enantiômeros puros. Foi observado um maior alargamento das bandas cromatográficas a volumes mais baixos de injeção e um decréscimo constante nos tempos de retenção à medida que foi aumentado o volume de injeção. Este comportamento pode ser associado ao tipo do modelo de isoterma de adsorção o qual os dados experimentais foram ajustados.

Sugestões para futuros trabalhos

Os resultados obtidos na presente dissertação de mestrado possibilitaram a avaliação de aspectos de separação, de transferência de massa e de equilíbrio para a separação cromatográfica da cetamina na fase estacionária MCTA.

As metodologias implantadas poderão servir como ferramentas experimentais de análise de outros sistemas de separação incluindo outras misturas racêmicas e diversas fases estacionárias. Neste sentido apresentamos como sugestões para futuros trabalhos na área abordada:

- Estudar a dependência da concentração no processo de transferência de massa;
- Determinação das isothermas de adsorção a temperatura de 30, 40 e 50 °C visando a utilização destes resultados para projetar experimentos no leito móvel simulado a temperaturas elevadas que 25 °C;
- Determinação das isothermas de adsorção competitivas;
- Estudar a simulação computacional dos perfis de eluição obtidos neste trabalho;
- A implantação dos dados obtidos na análise da separação da cetamina utilizando MCTA em um sistema preparativo do tipo leito móvel simulado, de modo a auxiliar a interpretação mais completa do processo de separação em maior escala.

Bibliografia

- ABOUL-ENEIN, H. Y.; *High-performance liquid chromatography enantioseparation of drugs containing multiple chiral centers on polysaccharide-type chiral stationary phases*. Journal of Chromatography A, 906, 185 – 193, 2001.
- ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; DE JONGH, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L.; *Química orgânica*. Editora Guanabara, 2ª edição, 1978.
- ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R.; *Analysis of affinity separations II: The characterizations of affinity columns by pulse techniques*. Chemical Engineering Journal, 30, B25 – B36, 1985a.
- ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R.; *Liquid chromatography plate height equations*. Journal of Chromatography, 330, 159 – 166, 1985b.
- CABRERA, K.; LUBDA, D.; *Influence of temperature on chiral high-performance liquid chromatographic separations of oxazepam and Prominal on chemically bonded β -cyclodextrin as stationary phase*. Journal of Chromatography A, 666, 433 – 438, 1994.
- CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; *Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação*. Série Apontamentos, Editora da UFSCar, 2001.
- CASS, Q. B.; TIRITAN, M. E.; BASSI, A. L.; CALAFATTI, S. A.; DEGANI, A. L. G.; *Discriminação quiral por CLAE em carbamatos de polissacarídeos: desenvolvimento, aplicações e perspectivas*. Química Nova, 20, 49 – 57, 1997.
- CAVAZZINI, A.; FELINGER, A.; KACZMARSKI, K.; SZABELSKI, P.; GUIOCHON, G.; *Study of the adsorption equilibria of the enantiomers of 1-phenyl-1-propanol on cellulose tribenzoate using microbore column*. Journal of Chromatography A, 953, 55 – 66, 2002.

- COLLINS, C. H.; Em *Introdução a métodos cromatográficos*, COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S., Editora da UNICAMP, 7ª edição, p 21 - 25, 1997.
- CHERRAK, D.; KHATTABI, S.; GUIOCHON, G.; *Adsorption behavior and prediction of the band profiles of the enantiomers of 3-chloro-1-phenyl-1-propanol: influence of the mass transfer kinetics*. Journal of Chromatography A, 877, 109 – 122, 2000.
- CIOLA, R.; *Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC*. Editora Edgard Blücher LTDA, 2000.
- CREMASCO, M. A.; *Fundamentos de transferência de massa*. Editora da UNICAMP, Campinas – SP, p. 50 – 51, 1998.
- CREMASCO, M. A.; HRITZKO, B. J.; XIE, Y.; WANG, N. H. L.; *Parameters estimation for amino acids adsorption in a fixed bed by moment analysis*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 18, 02, 181 – 194, 2001.
- DORAN, P. M.; *Bioprocess engineering principles*. Academic Press Limited, 3rd Edition, 1998.
- DE CAMP, W. H.; In *Chiral liquid chromatography*, LOUGH, W. J., Ed., Blackie, Glasgow, 1989.
- FAUSNAUGH, J. L.; In *Fundamentals of protein biotechnology*, STEIN, S., Marcel Dekker Inc., p 59, 1990.
- FRANCOTTE, E.; HUYNH, D.; *Immobilized halogenophenylcarbamate derivatives of cellulose as novel stationary phases for enantioselective drug analysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 27, 421 – 429, 2002.
- FRANCOTTE, E. R.; *Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drugs enantiomers*. Journal of Chromatography A, 906, 379 – 397, 2001.
- FRANCOTTE, E. R.; *Contribution of preparative chromatographic resolution to the investigation of chiral phenomena*. Journal of Chromatography A, 666, 565 – 601, 1994.

- FRANCOTTE, E.; WOLF, R. M.; LOHMANN, D.; *Chromatographic resolution of racemates on chiral stationary phases: influence of the supramolecular structure of cellulose triacetate*. Journal of Chromatography, 347, 25 – 37, 1985.
- GOLSHAN-SHIRAZI, S.; GHODBANE, S.; GUIOCHON, G.; *Comparison between experimental and theoretical band profiles in nonlinear liquid chromatography with a pure mobile phase*. Analytical Chemistry, 60, 2630 – 2634, 1988.
- GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, C. H.; Em *Introdução a métodos cromatográficos*, COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S., Editora da UNICAMP, 7ª edição, p 185 – 195, 1997.
- GUIOCHON, G.; *Preparative liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 965, 129 – 161, 2002.
- GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M.; *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*. Academic Press, Boston, MA, p 81 – 83, 1994.
- GRITTI, F.; PIATKOWSKI, W.; GUIOCHON, G.; *Study of the mass transfer kinetics in a monolithic column*. Journal of Chromatography A, 983, 51 – 71, 2003a.
- GRITTI, F.; GOTMAR, G.; STANLEY, B.; GUIOCHON, G.; *Determination of single component isotherms and affinity energy distribution by chromatography*. Journal of Chromatography A, 988, 185 – 203, 2003b.
- HAGINAKA, J.; *Pharmaceutical and biomedical applications of enantioseparations using liquid chromatographic techniques*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 27, 357 – 372, 2002.
- RUTHVEN, D. M.; *Principles of Adsorption and Adsorption Process*, Wiley, New York, 1984.
- JACOBSON, J.; FRENZ, J.; HORVÁTH, C.; *Measurement of adsorption isotherms by liquid chromatography*. Journal of Chromatography, 316, 53 – 68, 1984.

- JACOBSON, C. S.; SEIDEL-MORGENSTERN, A.; GUIOCHON, G.; *Study of band broadening in enantioselective separations using microcrystalline cellulose triacetate: I. The linear case*. Journal of Chromatography, 637, 13 – 18, 1993.
- JAMES, F.; SEPÚLVEDA, M.; CHARTON, F.; QUIÑONES, I.; GUIOCHON, G.; *Determination of binary competitive equilibrium isotherms from the individual chromatographic band profiles*. Chemical Engineering Science, 54, 1677 – 1696, 1999.
- KACZMARSKI, K.; CAVAZZINI, A.; SZABELKI, P.; ZHOU, D.; LIU, X.; GUIOCHON, G.; *Application of the general rate model and the generalized Maxwell-Stefan equation to the study of the mass transfer kinetics of a pair of enantiomers*. Journal of Chromatography A, 962, 57 – 67, 2002.
- KOLLER, H.; RIMBÖCK, K.; MANNSCHRECK, A.; *High-pressure liquid chromatography on triacetylcellulose: characterization of a sorbent for the separation of enantiomers*. Journal of Chromatography, 282, 89 – 94, 1983.
- KOKOLKOVAS, A.; *Dicionário terapêutico*. Editora Guanabara, Rio de Janeiro – RJ, 1994 – 1995.
- KRIJGMAN, J.; *Product recovery in bioprocess technology*. Butterworth-Heinemann, 1st Edition, 1995.
- MAIER, N.; FRANCO, P.; LINDER, W.; *Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives*. Journal of Chromatography A, 906, 3 – 33, 2001.
- MIHLBACHLER, K.; KACZMARSKI, K.; SIEDEL-MORGENSTERN, A.; GUIOCHON, G.; *Measurement and modeling of the equilibrium behavior of the Tröger's base enantiomers on a amylose-based chiral stationary phase*. Journal of Chromatography A, 955, 35 – 52, 2002.
- MIYABE, K.; SUZUKI, M.; *Chromatography of liquid-phase adsorption on octadecylsilyl-silica gel*. AIChE Journal, 38, 6, 901 – 910, 1992.

- MIYABE, K.; GUIOCHON, G; *Kinetic study of the mass transfer of S-Tröger base in the system cellulose triacetate and ethanol*. Journal of Chromatography, 849, 445 – 465, 1999.
- MORRISON, R.; BOYD, R.; *Química orgânica*. Fundação Calouste Gulbenkian, 12^a edição, 1983.
- NISHIZAWA, N., NAKAO, S., NAGATA, A., HIROSE, T., MASUZAWA, M., SHINGU, K.; *The effect of ketamine isomers on both mice behavioral responses and c-Fos expression in the posterior cingulate and retrosplenial cortices*. Brain Research, 857, 188 – 192, 2000.
- OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M.; HATADA, K.; *Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatography resolution of enantiomers: phenylcarbamates of polysaccharides coated on silica gel*. Journal of American Society, 106, 5357 - 5359, 1984a.
- OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M.; YAMAMOTO, K.; HATADA, K.; *Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatography resolution: cellulose triacetate and tribenzoate coated on macroporous silica gel*. Chemical Letters, 739 – 742, 1984b.
- OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y.; ABURATAN, R.; HATADA, K.; In *Chiral Separations by liquid chromatography*, AHUJA, S., Chapter 5, American Chemical Society, Washington, DC, 1991.
- OKAMOTO, Y., KAIDA, Y., *Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases*. Journal of Chromatography A, 666, 403 – 419, 1994.
- OKAMOTO, Y., NOGUCHI, J., YASHIMA, E., *Enantioseparation on 3,5-dichloro- and 3,5-dimethylphenylcarbamates of polysaccharides as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography*. Reactive & Functional Polymers, 37, 183 – 188, 1998.

- PAIS, S. L.; LOUREIRO, J. M.; RODRIGUES, A. E.; *Separation of enantiomers of a chiral epoxide by simulated moving bed chromatography*. Journal of Chromatography A, 827, 215 – 233, 1998.
- PIRKLE, W. H.; POCHAPSKY, T. C.; In *Packing and stationary phases in chromatographic techniques*, UNGER, K. K., Marcel Dekker, Inc., p 784, 1990.
- PIRKLE, W. H.; PORCHAPSKY, T. C.; *Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers*. Chemical Review, 89, 347 – 362, 1989.
- PRYDE, A.; In *Chiral liquid chromatography*, LOUGH, W. J., Ed., Blackie, Glasgow, 1989.
- REARDEN, P.; SAJONZ, P.; GUIOCHON, G.; *Detailed study of the mass transfer kinetics of Tröger base on cellulose triacetate*. Journal of Chromatography A, 813, 1 – 9, 1998.
- REKOSKE, J. A.; *Chiral separation*. AIChE Journal, 47, 1, 2 – 5, 2001.
- RIZZI, A. M.; *Evaluation of the optimization potential in high-performance liquid chromatographic separations of optical isomers with swollen microcrystalline cellulose triacetate*. Journal of Chromatography, 478, 1001 – 119, 1989a.
- RIZZI, A. M.; *Band broadening in high-performance liquid chromatographic separations of enantiomers with swollen microcrystalline cellulose triacetate packings: influence of capacity factor, analyte structure, flow velocity and column loading*. Journal of Chromatography, 478, 71 – 86, 1989b.
- RIZZI, A. M.; *Band broadening in high-performance liquid chromatographic separations of enantiomers with swollen microcrystalline cellulose triacetate packings: influence of eluent composition, temperature and pressure*. Journal of Chromatography, 478, 87 – 99, 1989c.
- SCHULTE, M.; DITZ, R.; DEVANT, R. M.; KINKEL, J. N.; CHARTON, F.; *Comparison of the specific productivity of different chiral stationary phases used for simulated moving-bed chromatography*. Journal of Chromatography A, 769, 93 – 100, 1997.

- SEWELL, P. A.; CLARKE, B.; *Chromatographic separations*. John Wiley & Sons, 1987.
- SEIDEL-MONRGENSTERN, A.; JACOBSON, S. C.; GUIOCHON, G.; *Study of band broadening in enantioselective separations using microcrystalline cellulose triacetate: II. Frontal analysis*. Journal of Chromatography, 637, 19 – 28, 1993.
- SEIDEL-MONRGENSTERN, A.; GUIOCHON, G.; *Modelling of the competitive isotherms and the chromatographic separation of two enantiomers*. Chemical Engineering Science, 48, 15, 2787 – 2797, 1993a.
- SEIDEL-MONRGENSTERN, A.; GUIOCHON, G.; *Thermodynamics of the adsorption of Tröger's base enantiomers from ethanol on cellulose triacetate*. Journal of Chromatography, 631, 37 – 47, 1993b.
- SILVA, P.; *Farmacologia*. Editora Guanabara Koogan, 5ª edição, Rio de Janeiro – RJ, 1998.
- SOLOMONS, T. W. G.; *Química Orgânica Vol. I*. LTD, 6ª edição, 1996.
- SHIBATA, T.; OKAMOTO, I.; ISHII, K.; *Chromatographic optical resolution on polysaccharide and their derivatives*. Journal of Liquid Chromatography, 9, 313 – 340, 1986.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; *Introduction to modern liquid chromatography*, New York, John Wiley & Sons, 2nd edition, 1979.
- SUZUKI, M.; *Adsorption engineering*, Kodansha-Elsevier, Tokyo, p. 179, 1990.
- SVENSSON, J.; GUSTAFSSON, L. L.; *Determination of ketamine and norketamine enantiomers in plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B, 678, 373 - 376, 1996.
- HEARD, C. M.; BRAIN, K. R.; In *Highly selective separations in biotechnology*, STREET, G., Blackie Academic & Professional, 1st edition, 1994.
- WANNACHERL, F. F. D.; *Farmacologia clínica – fundamentos da terapêutica racional*. Editora Guanabara, 12ª edição, Rio de Janeiro – RJ, 1998.

WELTY, J. R., WICKS, C. E., WILSON, R. E.; *Fundamentals of momentum, heat and mass transfer*, John Wiley & Sons Inc., 3rd edition, p. 494 – 496, 1984.

YANAGIHARA, Y., OHTANI, M., KARIYA, S., UCHINO, K., AOYAMA, T., YAMAMURA, Y., IGA, T.; *Stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of ketamine and its active metabolic, norketamine, in human plasma*. Journal of Chromatography B, 746, 227 – 231, 2000.

YASHIMA, E.; *Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation*. Journal of Chromatography A, 906, 105 – 125, 2001.